

Analyse der Translationseffizienz des
HCV-RNA-Genoms und der
Translations-Initiationskomplexe
unter verschiedenen Bedingungen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Florian Giering
aus Wiesbaden

Gießen, 2013

Biochemisches Institut
Gf. Direktor: Prof. Dr. Lienhard Schmitz
Friedrichstraße 24
35390 Gießen

Gutachter: Prof. Dr. M. Niepmann

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Tag der Disputation: 12.08.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Hepatitis C Virus	1
1.1.1	Struktur und Genom	2
1.1.2	Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus	5
1.2	Molekulare Mechanismen der Translation	7
1.2.1	Die cap-abhängige Initiation der Translation	7
1.2.2	Die IRES-vermittelte Initiation der Translation	10
1.2.3	Interaktion der HCV-RNA mit weiteren zellulären Proteinen	12
1.3	microRNAs	14
1.3.1	Biogenese und Funktion	14
1.3.2	Die leberspezifische miR-122	16
1.4	Ziele dieser Arbeit	17
2	Ergebnisse und Diskussion	19
2.1	Translationseffizienz von verschiedenen HCV-Insertions-Mutanten	19
2.1.1	Konstrukte	19
2.1.2	Transfektion in Zellen	20
2.1.2.1	Vergleich der miR-122-gesteigerten Translationseffizienz in HuH-7-Zellen	21
2.1.2.2	Vergleich der miR-122-gesteigerten Translationseffizienz in HuH-7.5-Zellen	25
2.1.2.3	Vergleich der miR-122-gesteigerten Translationseffizienz in HuH-7-Zellen unter Verwendung von (dT)miR-122	26
2.1.3	Fazit	27
2.2	Technische Diskussion Teil I	28
2.2.1	Theoretische Stör- und Einflussvariablen bei der Transfektion	28
2.2.2	Einfluss des Angeborenen Immunsystems auf die Transfektion	32
2.2.3	Vorhergesagte Sekundärstrukturen der verwendeten HCV-Konstrukte	34
2.3	Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe	36
2.3.1	Prinzip der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	36
2.3.2	Optimierung der Methode für HuH-7-Zellen	38
2.3.3	Identifizierung der 48S-/80S-HCV-Translations-Initiationskomplexe	40
2.3.4	Analyse der Sucrose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation	41
2.3.5	miR-122 hat keinen Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe	43
2.3.6	Nukleotid-Insertionen in der HCV-5'-UTR zeigen keinen Effekt auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe	44
2.3.7	Fazit	46
2.4	Technische Diskussion Teil II	47
2.4.1	Optimierung der <i>in vivo</i> – Translationen	47
2.4.2	Der Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe ist <i>in vivo</i> anders als <i>in vitro</i>	49
3	Schlussdiskussion	51
3.1	Die räumliche Nähe des miRNP-Komplexes zum Stem-Loop II der HCV-IRES ist Voraussetzung für die miR-122-vermittelte Stimulation der HCV-Translationseffizienz	51
3.2	Kinetische Analysen der Bildung von Translations-	

	Initiationskomplexen <i>in vivo</i>	54
4	Material und Methoden	58
4.1	Material	58
4.1.1	Zellkultur.....	58
4.1.1.1	Zellen.....	58
4.1.1.2	Chemikalien.....	58
4.1.2	Molekularbiologie.....	58
4.1.2.1	Plasmide.....	58
4.1.2.2	Oligonukleotide.....	59
4.1.2.3	Restriktionsenzyme.....	59
4.1.2.4	Nukleotide.....	59
4.1.2.5	Enzyme.....	59
4.1.2.6	Größenstandards.....	60
4.1.2.7	Kits.....	60
4.1.2.8	Andere Chemikalien.....	60
4.1.3	Geräte.....	61
4.1.4	Verbrauchsmaterial.....	61
4.2	Methoden	63
4.2.1	Zellkultur.....	63
4.2.1.1	Passagieren von Zellen.....	63
4.2.1.2	Aussaat von Zellen.....	63
4.2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	64
4.2.2.1	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	64
4.2.2.2	Ethanol-Präzipitation.....	64
4.2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	64
4.2.2.4	Template-Reinigung.....	65
4.2.2.5	<i>In vitro</i> – Transkription.....	66
4.2.2.6	Capping-Reaktion.....	66
4.2.2.7	Herstellung radioaktiv markierter RNA.....	67
4.2.2.8	microRNA-Herstellung.....	67
4.2.3	Nachweis von Nukleinsäuren.....	68
4.2.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	68
4.2.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	68
4.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	69
4.2.4.1	Transfektion von Zellen mit RNA	69
4.2.4.2	Transfektion von Zellen mit radioaktiv markierter RNA.....	70
4.2.4.3	Kotransfektion von Zellen.....	70
4.2.4.4	WST1-Messung.....	70
4.2.5	Protein-RNA-Wechselwirkungen.....	71
4.2.5.1	Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation.....	71
4.2.5.2	Herstellung der Gradienten.....	71
4.2.5.3	Ultrazentrifugation.....	72
4.2.5.4	Fraktionierung.....	72
4.2.5.5	Herstellung des Lyse-Puffers.....	72
4.2.5.6	Re-Extraktion	73
4.2.7	Statistik.....	73
	Zusammenfassung	74
	Summary	75
	Abkürzungen und Glossar	76

Abbildungsverzeichnis.....	79
Tabellenverzeichnis.....	80
Literaturverzeichnis.....	81
Anhang.....	93
Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....	98
Erklärung zur Dissertation.....	99
Danksagung.....	100
Lebenslauf.....	101

1 Einleitung

Als Viren (*virus*, lat. „Gift, Schleim“) werden spezielle Partikel mit circa 20 - 300 nm Größe bezeichnet. Sie enthalten ein Genom entweder aus DNA oder RNA, welches meist in einer Proteinhülle, dem Kapsid, verpackt ist. Manche Viren besitzen zusätzlich noch eine Virushülle aus Lipiden und viralen Hüllproteinen. Als obligat intrazelluläre Parasiten sind sie nicht in der Lage, selbstständig Proteinbiosynthese zu betreiben, weshalb sie für die Replikation auf lebende Zellen angewiesen sind. Es gibt Viren sowohl für eukaryotische als auch für prokaryotische Zellen, in letzterem Fall werden sie auch als Bakteriophagen bezeichnet.

Das Internationale Komitee der Taxonomie der Viren (ICTV) listet in seinem Report aus dem Jahre 2011 insgesamt 2480 Virus-Spezies auf, die wiederum in 94 Familien eingeordnet werden können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Hepatitis C Virus, welches spezifisch die Leber infiziert und bedeutsamster Auslöser für die chronische Hepatitis ist.

1.1 Das Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus wird in die Familie der *Flaviviridae* klassifiziert (Lindenbach *et al.*, 2001) und bildet dort neben den HGV/GBV-A/B/C-Viren die Gattung der *Hepaciviren* (Simmonds, 2001). Insgesamt umfasst die Familie der *Flaviviridae* drei Gattungen. Neben den *Hepaciviren* existieren noch die Gattungen *Flavivirus* (Gelbfieberevirus u.a.) sowie *Pestivirus* (Bovines Virusdiarrhoe-Virus u.a.) (Thiel *et al.*, 2005).

Erstmals beschrieben wurde das Genom des Hepatitis C Virus in Choo *et al.* (1989) und als Auslöser der NonA-NonB-Hepatitis identifiziert. Mittlerweile sind auf Grund der starken Heterogenität der isolierten HCV (Pawlotsky, 2003) insgesamt 6 Genotypen des HCV bekannt, die wiederum in Subtypen untergliedert werden können (Simmonds *et al.*, 2005).

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO, *world health organization*) sind weltweit ca. 170 Millionen Menschen mit dem Virus chronisch infiziert. Überwiegend parenteral übertragen führt HCV zur akuten Hepatitis, die jedoch in 85 % der Fälle asymptomatisch verläuft. 75 % der asymptomatischen HCV-Infektionen verlaufen chronisch. Ungefähr 30 % der Leberzirrhosen und 25 % der primären Leberzellkarzinome sind auf das Hepatitis C Virus zurückzuführen.

1.1.1 Struktur und Genom

Das HCV-RNA-Genom liegt als einzelsträngige RNA mit Positivstrang-Orientierung vor und besteht aus circa 9.600 Nukleotiden. Zum Schutz vor Abbau bildet das Core-Protein das die HCV-RNA umgebende Nukleokapsid (Penin, 2003), welches wiederum umgeben wird von einer Membranhülle, die von der Wirtszelle stammt. Dort eingelagert sind die viralen Glykoproteine E1 und E2. Beobachtet wird auch eine Assoziation der viralen Partikel mit Lipoproteinen in humanem Serum (André *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2006). Der Durchmesser eines HCV-Partikels (s. Abbildung 1.1.1) wird in elektronenmikroskopischen Untersuchungen in etwa mit 40 – 70 nm angegeben (Wakita *et al.*, 2005).

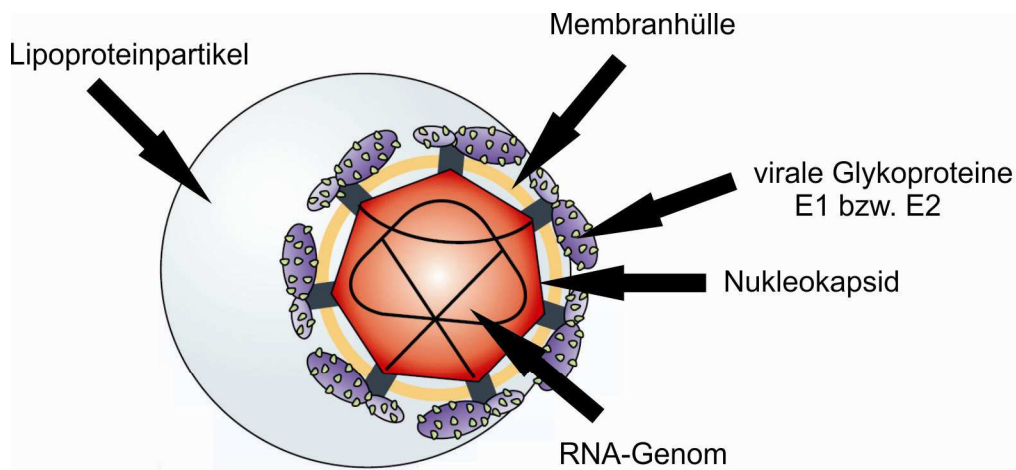


Abb. 1.1.1 HCV-Partikel. Modell des HCV-Partikels (im Serum häufig mit den Lipoproteinpartikeln LDL bzw. VLDL assoziiert) bestehend aus dem RNA-Genom, welches von einem Nukleokapsid umgeben wird. Darüber die von der Wirtszelle stammende Membranhülle und die darin integrierten viralen Glykoproteine E1 und E2. Modifiziert aus Moradpour *et al.*, 2007.

Das HCV-RNA-Genom (s. Abbildung 1.1.2) enthält den offenen Leserahmen (*engl.* open reading frame, ORF), der für ein einziges Polyprotein kodiert sowie flankiert wird von 5'- bzw. 3'-nicht-kodierenden Enden (*engl.* 5'-/3'-non-coding region, 5'-/3'-NCR). Diese Enden werden auch als 5'- bzw. 3'-UTR (*engl.* 5'-/3'-untranslated region, 5'-/3'-UTR) bezeichnet, weil ihre Nukleotid-Sequenz nicht für Proteine kodiert. Als cis-regulatorische Elemente spielen sie jedoch bei der Translation und Replikation der HCV-RNA eine entscheidende Rolle (Bartenschlager *et al.*, 2004; Appel *et al.*, 2006). Der ORF kodiert für Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine.

Die 5'-UTR ist unter den HCV-Isolaten hochkonserviert und besteht aus vier Domänen, die wiederum verschiedene Aufgaben erfüllen. So sind die Domänen I und II notwendig

für die HCV-Replikation (Friebe *et al.*, 2001), die Domänen II, III und IV sowie die ersten Nukleotide der Core-kodierenden Region bilden die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (*engl.* internal ribosome entry site, IRES), die für die cap-unabhängige Translation von essentieller Bedeutung ist (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Borman und Jackson, 1992).

Die 3'-UTR besteht aus einer kurzen variablen Region, einem poly(U/UC)-Trakt mit einer durchschnittlichen Länge von 80 Nukleotiden und einem 98 Nukleotide langen Schwanz (Kolykhalov *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 1996). Die 3'-UTR ist notwendig für die Replikation *in vitro* (Friebe und Bartenschlager, 2002; Yi und Lemon, 2003) und *in vivo* (Yanagi *et al.*, 1999; Kolykhalov *et al.*, 2000) sowie für eine effektive Stimulation der Translation (Song *et al.*, 2006; Bradrick *et al.*, 2006).

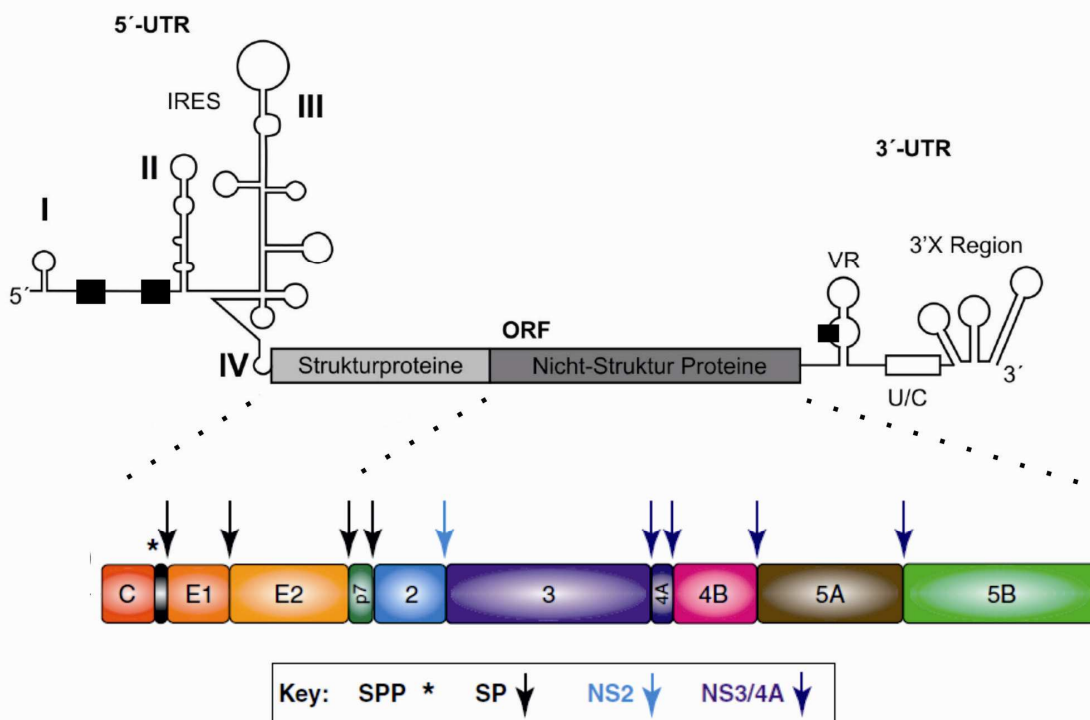


Abb. 1.1.2 HCV-Genom. Schema des HCV-Genoms mit offenem Leseraster (*engl.* open reading frame, ORF), flankiert am 5'- und 3'-Ende von nicht-kodierenden Regionen (*engl.* untranslated region, UTR). Dabei bilden die Schleifen II, III und IV sowie Teile der Core-kodierenden Sequenz die HCV-IRES, die eine cap-unabhängige Translation ermöglicht. Die 3'-UTR besteht aus Variabler Region (VR), einem Poly(U/C)-Trakt (U/C) sowie der 3'X-Region. Das aus dem ORF resultierende Polyprotein wird co- und posttranslational prozessiert zu Struktur- und Nicht-Struktur-Proteinen durch die entsprechend abgebildeten Enzyme SSP (Signalpeptidase), SP (Signalpeptidase) sowie NS2 und NS3/4A. Markiert mit einem schwarzen Kasten sind jeweils die potentiellen miR-122-Bindestellen. *Modifiziert aus Bartenschlager et al.*, 2011.

Aus der IRES-vermittelten Translation des offenen Leserahmens resultiert ein Polyprotein, welches co- und posttranslational von zellulären und viralen Proteasen in Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine prozessiert wird. Zu den Strukturproteinen zählen

das Core-Protein sowie die Hüllproteine E1 und E2. Das Core-Protein wird am Endoplasmatischen Retikulum (ER) mittels Signalpeptidasen prozessiert und bildet als α -helikales Protein (Boulant *et al.*, 2006) das virale Nukleokapsid mit einer Länge von 173 – 179 Aminosäuren (McLauchlan *et al.*, 2002). Die Beobachtung, dass die zentrale, hydrophobe Domäne D2 des Core-Proteins assoziiert sein kann mit Lipoproteinen (Boulant *et al.*, 2006), könnte richtungsweisend sein für die Erklärung der Tatsache, dass Patienten mit Hepatitis C häufig eine Fettleber entwickeln (Asselah *et al.*, 2006). Die Hüllproteine E1 und E2 sind als Membranproteine glykosyliert und bilden einen nicht-kovalenten heterodimeren Komplex. E1 ist an der Freisetzung der viralen RNA beteiligt (Garry und Dash, 2003), E2 unterstützt die Rezeptorbindung während der Anheftung und damit die Fusion des HCV-Partikels mit der Wirtszelle (Pileri *et al.*, 1998). Neben den Strukturproteinen werden durch den ORF auch Nicht-Struktur-Proteine kodiert, die in Tabelle 1.1.1 mit ihrer Funktion aufgelistet sind.

Bezeichnung		Funktion
NS1	p7	Transmembranprotein Familie der „Viroporine“ (Griffin <i>et al.</i> , 2003) möglicherweise Ionenkanal (Khaliq <i>et al.</i> , 2001; Wozniak <i>et al.</i> , 2010); <i>in vitro</i> nachgewiesen als Calcium-Ionenkanal (Griffin <i>et al.</i> , 2003; Griffin <i>et al.</i> , 2004)
NS2	p23	Transmembranprotein Cystein-Protease (Hijikata <i>et al.</i> , 1993) assoziiert mit ER-Membran (Yamaga und Ou, 2002)
NS3	p70	Metalloprotease (Chevaliez und Pawlotsky, 2006) Serin-Protease (Bartenschlager <i>et al.</i> , 2010; Bartenschlager <i>et al.</i> , 2011) RNA-Helikase (Bartenschlager <i>et al.</i> , 2011)
NS4A	p8	Co-Faktor für NS3 (Tanji <i>et al.</i> , 1995; Tomei <i>et al.</i> , 1996)
NS4B	p27	Ausbildung des „membranous web“ (Egger <i>et al.</i> , 2002) Integrales Membranprotein der ER-Membran (Lundin <i>et al.</i> , 2003)
NS5A	p56/58	RNA-Bindeprotein (Brass <i>et al.</i> , 2006) Assemblierung neuer Viruspartikel (Appel <i>et al.</i> , 2008)
NS5B	p68	RNA-abhängige RNA-Polymerase (Behrens <i>et al.</i> , 1996)

Tabelle 1.1.1 Nicht-Strukturproteine des ORF des HCV-Genoms. Aufgelistet sind die Nicht-Strukturproteine des ORF des HCV-Genoms mit ihren bisher bekannten Funktionen.

1.1.2 Der Infektionszyklus des Hepatitis C Virus

Das Hepatitis C Virus repliziert bevorzugt in Hepatozyten. Als Rezeptoren für HCV konnten bisher CD81 (Pileri *et al.*, 1998), der LDL-Rezeptor (Agnello *et al.*, 1999), der Scavenger-Rezeptor Klasse B Typ I (Scarselli *et al.*, 2002), SCARB1 (Scarselli *et al.*, 2002) sowie die Membranproteine Claudin-1 (Evans *et al.*, 2007) und Occludin (Liu *et al.*, 2009; Ploss *et al.*, 2009) identifiziert werden (siehe Abbildung 1.1.3).

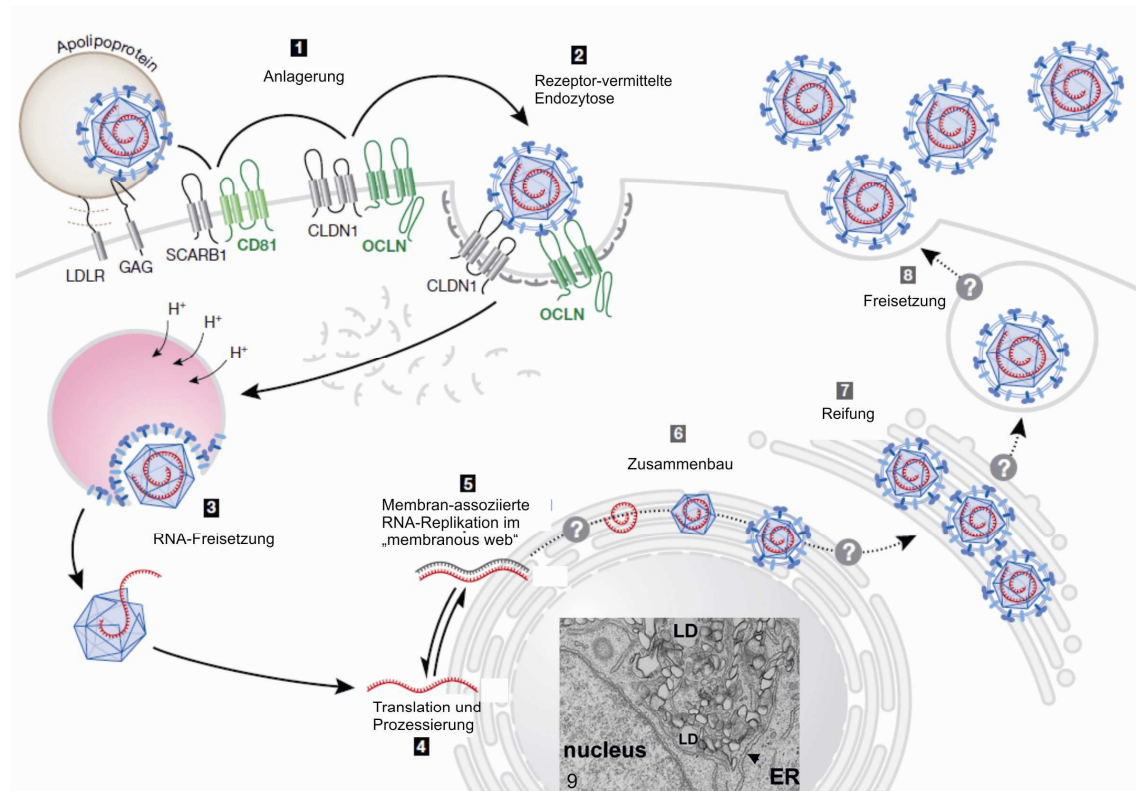


Abb. 1.1.3 Infektionszyklus des HCV. Das Hepatitis C Virus wird nach Interaktion mit verschiedenen hepatischen Oberflächenrezeptoren (1) mittels Clathrin-vermittelter Endozytose (2) in das Zytoplasma der Wirtszelle aufgenommen, wo das HCV-Genom pH-abhängig freigesetzt werden kann (3). Auf Grund seiner positiven Orientierung steht die HCV-RNA direkt für die IRES-vermittelte Translation des Polyproteins am Endoplasmatischen Retikulum zur Verfügung, an dessen Membranen es co- und posttranskriptional prozessiert wird (4). Nach Replikation der HCV-RNA (5) im sogenannten „membranous web“ (bestehend aus Teilen der Membran des ER sowie LDs; siehe auch Elektronenmikroskopische Aufnahme [9]) und Zusammenbau/Reifung des Viruspartikels (6/7) am ER kann das fertige HCV-Virion mittels Exozytose freigesetzt werden (8). *Modifiziert nach Ploss und Rice (2009) und Bartenschlager *et al.*, 2010.*

Zusätzlich bindet das Hüllprotein E2 das Transmembranprotein L-SIGN (*engl.* liver/lymph node-specific intercellular adhesion-molecule-3-grabbing integrin), welches auf den hepatischen sinusidalen Endothelzellen exprimiert wird und damit eine weitere Begründung dafür liefert, warum HCV bevorzugt Hepatozyten infiziert (Gardner *et al.*, 2003; Cormier *et al.*, 2004). HCV wird nach Rezeptorbindung über eine Clathrin-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen (Blanchard *et al.*, 2006), woraufhin das HCV-Genom freigesetzt werden kann. Dies geschieht pH-abhängig

(Koutsoudakis *et al.*, 2006; Tscherne *et al.*, 2006) mittels Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran unter Beteiligung der beiden Hüllproteine E1 und E2 (Lavillette *et al.*, 2007; Garry und Dash, 2003).

Im Zytoplasma kann das HCV-Genom auf Grund seiner positiven Orientierung direkt am Endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert werden, wozu es sich des zellulären Repertoires an ribosomalen Proteinen bedient, gleichwohl es nicht Kappen-abhängig, sondern vermittelt über die HCV-5'-IRES (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993) translatiert wird. Das resultierende Polyprotein (siehe Abb. 1.1.2) wird co- und posttranskriptional durch zelluläre Signalpeptidpeptidasen und Signalpeptidasen sowie durch die viralen Proteine NS2 und NS3/4A gespalten (Hijikata *et al.*, 1991; Grakoui *et al.*, 1993; Bartenschlager *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994; Santolini *et al.*, 1995; Failla *et al.*, 1995). Sämtliche daraus entstehenden viralen Proteine sind mit der Membran des ER direkt oder indirekt assoziiert. NS4B sowie NS5 induzieren die Bildung des sogenannten „membranous web“, welches Teile der Membran des ER sowie LDs (*engl.* lipid droplets) enthält (Bartenschlager *et al.*, 2010) und unter dem Elektronenmikroskop als RV (*engl.* membranous replication vesicles) sichtbar wird. Hier findet folgend die Replikation des HCV-Genoms statt. Dabei dient das Protein NS5B als RNA-abhängige RNA-Polymerase und kopiert die mitgebrachte HCV-RNA mit positiver Orientierung in negativ-orientierte RNA, welche dann wiederum als Matrize für die Synthese neuer HCV-RNA mit positiver Orientierung dient (Bartenschlager *et al.*, 2010; Ashfaq *et al.*, 2011). Die so hergestellte HCV-RNA kann dann wiederum erneut translatiert werden, als Matrize für die Replikation zur Verfügung stehen oder in ein Viruskapsid verpackt werden.

Nach bisherigem Verständnis akkumulieren Core-Proteine auf den LDs, und über eine Interaktion der Core-Proteine mit dem viralen Protein NS5A, welches die Fähigkeit besitzt, RNA zu binden (Brass *et al.*, 2006), wird die virale RNA in das Kapsid eingeschlossen (Kunkel *et al.*, 2001; Tang und Grisé, 2009; Bartenschlager *et al.*, 2010; Bartenschlager *et al.*, 2010). Das Viruskapsid kann anschließend von Teilen der ER-Membran, welche die viralen Hüllproteine E1 und E2 enthält, umschlossen und per Exozytose aus der Zelle geschleust werden (Penin *et al.*, 2004; Ashfaq *et al.*, 2011).

Für den Zusammenbau des Viruskapsids sind mehrere Faktoren notwendig, darunter auch zelluläre. Das Apolipoprotein E ist oftmals assoziiert mit dem Viruskapsid (Chang *et al.*, 2007; Benga *et al.*, 2010), eine Beteiligung des Apolipoproteins B wird kontrovers diskutiert (Jiang und Luo, 2009; Bartenschlager *et al.*, 2010). Die genaue Funktion der Apolipoproteine in Bezug auf den Zusammenbau des Viruskapsids ist bisher jedoch nicht geklärt.

1.2 Molekulare Mechanismen der Translation

Die Translation von mRNA in Eukaryoten bedingt das Vorhandensein einer 5'-Kappe sowie eines Poly(A)-Schwanzes. Da die HCV-RNA jedoch weder 5'-Kappe noch einen Poly(A)-Schwanz an ihrem 3'-Ende aufweist, muss sie sich für die Translation zwangsläufig eines anderen Mechanismus bedienen. Im Folgenden sind daher sowohl die eukaryotische, cap-abhängige Initiation der Translation beschrieben als auch die IRES-vermittelte Initiation der HCV-Translation.

1.2.1 Die cap-abhängige Initiation der Translation

Ziel der Initiation der Translation ist die Bildung des für die Elongation kompetenten 80S-Komplexes, die in verschiedenen Schritten unter Hinzuziehung verschiedener eukaryotischer Initiationsfaktoren (eine Übersicht gibt Tabelle 1.2.1) verläuft.

Erster Schritt ist die Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes, der aus der ribosomalen 40S-Untereinheit, dem ternären Komplex aus Initiator-tRNA (Methionyl-tRNA), eIF2 und GTP sowie den Initiationsfaktoren eIF3, eIF1 und eIF1A besteht (Maitra *et al.*, 1982). Die Bindung der Faktoren eIF1 und eIF1A führt zu Konformationsänderungen innerhalb der 40S-Untereinheit (Passmore *et al.*, 2007), was der nun folgenden Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA dient. Der Faktor eIF4F (bestehend aus eIF4E, eIF4A und eIF4G) sowie deren Kofaktoren eIF4H und eIF4B erkennen die 5'-Kappe der mRNA und entwinden das 5'-Ende (Jackson *et al.*, 2010). Ausschlaggebend für die Bindung der mRNA an diesen Komplex ist eIF4G, welcher die Affinität des eIF4E an die 5'-Kappe erhöht (Sonenberg *et al.*, 1979; Gross *et al.*, 2003; Volpon *et al.*, 2006). Der beteiligte Faktor eIF3 unterstützt dabei die Bindung der mRNA an diesen Komplex über eine Interaktion der carboxy-terminalen Domäne innerhalb des Eintrittskanals der ribosomalen 40S-Untereinheit (Siridechadilok *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2007). Sobald sich der 43S-mRNA-Komplex gebildet hat, beginnt der Scan-Vorgang entlang der 5'-UTR der mRNA, durch welchen das Start-Codon AUG gesucht wird (Kozak, 1991). Der Scan-Vorgang benötigt dabei die Faktoren eIF1 und eIF1A, welche den 43S-mRNA-Komplex stabilisieren und die vorzeitige Assoziation der ribosomalen 60S-Untereinheit verhindern (Passmore *et al.*, 2007; Pestova und Kolupaeva, 2002; Donahue, 2000; Maag *et al.*, 2006; Maag *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2007). Der genaue Mechanismus des Scan-Vorgangs ist bisher nicht bekannt, es scheint jedoch, als bedinge dieser die ständige Anwesenheit aller genannten Initiationsfaktoren (Passmore *et al.*, 2007; Jackson, 1991; Svitkin *et al.*,

2001; Pisarev *et al.*, 2008; Echeverria und Lorsch, 2012). Sobald das Start-Codon erkannt wurde, stimuliert der Faktor eIF5 die GTPase-Aktivität des eIF2 (Paulin *et al.*, 2001; Unbehaun *et al.*, 2004).

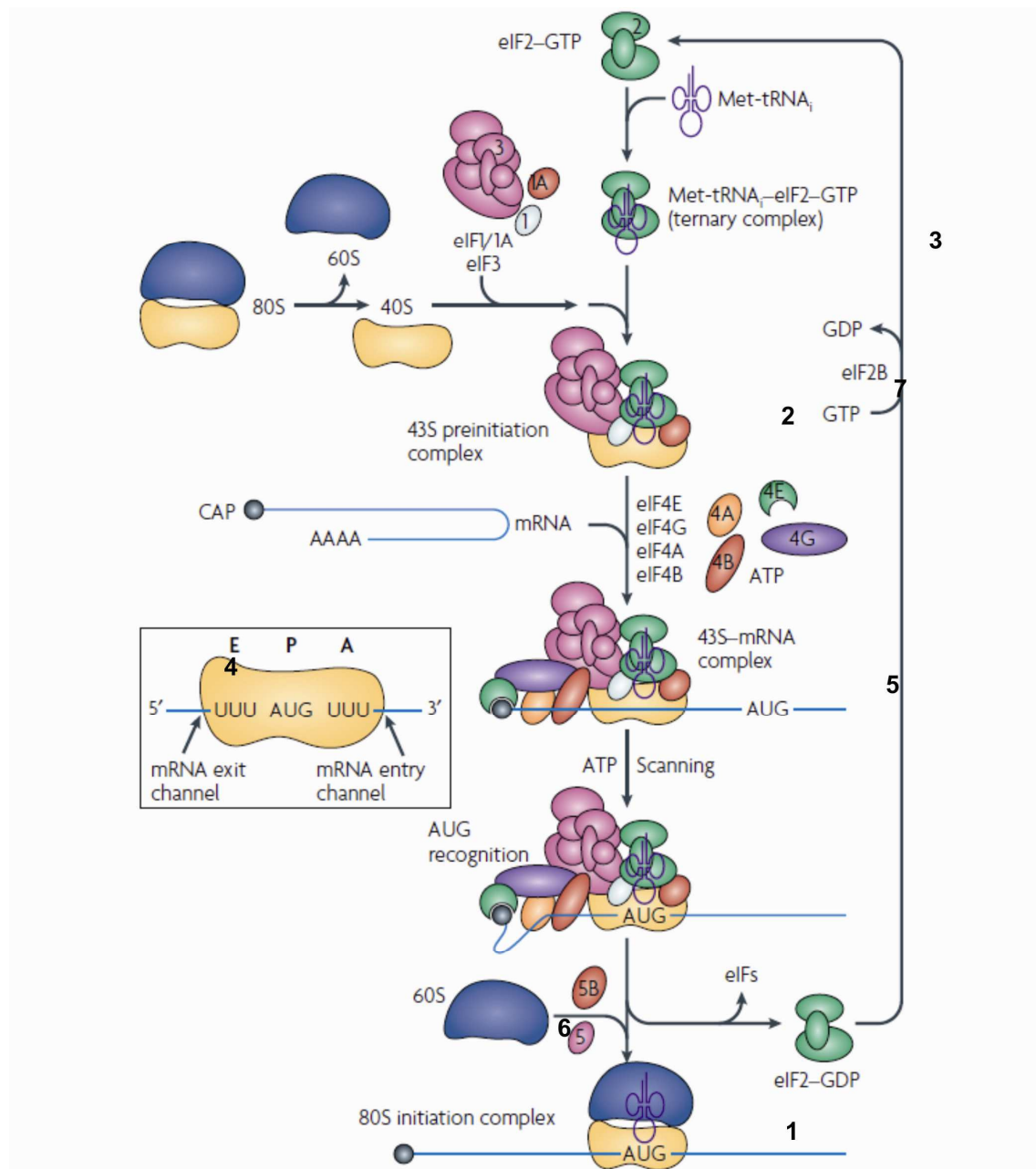


Abb. 1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation. Ziel der eukaryotischen Translationsinitiation ist die Bildung eines funktionsfähigen 80S-Initiationskomplexes (1), bestehend aus mRNA, dem 80S-Ribosom sowie der Met-tRNA. Beginnend bildet sich der 43S-Präinitiationskomplex (2), bestehend aus dem ternären Komplex Met-tRNA-eIF2-GTP (3), den Initiationsfaktoren eIF3, eIF1 und eIF1A und der ribosomalen 40S-Untereinheit (4). Letztere bildet den mRNA-Eintrittskanal (engl. mRNA entry channel), durch den die mRNA in der Elongationsphase der Translation nacheinander die Stellen A (engl. aminoacyl site), P (engl. peptidyl site) und E (engl. exit site) passieren kann (4). Zusammen mit der mRNA und dem Faktor eIF4F (bestehend aus eIF4E, eIF4G, eIF4A) sowie eIF4B bildet der 43S-Präinitiationskomplex den 43S-mRNA-Komplex (5), welcher die mRNA auf der Suche nach dem Start-Codon abscannt. Wird dieses erkannt, stimuliert eIF5 die GTPase-Aktivität von eIF2, wodurch es zur Hydrolyse des gebundenen GTP kommt. Durch den Faktor eIF5B wird folgend die Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit (6) stimuliert, es bildet sich der 80S-Initiationskomplex (1). Der Faktor eIF2B katalysiert den Austausch des an eIF2 gebundenen GDP zu GTP (7), sodass eIF2 dann wieder für die Bildung eines neuen Präinitiationskomplexes zur Verfügung steht. Modifiziert aus Fraser *et al.*, 2007.

eIF	Funktion
1	unterstützt den ribosomalen Scan-Vorgang auf der Suche nach dem Start-Codon; positioniert die mit Methionin beladene tRNA am Start-Codon
1A	stimuliert die Bindung des eIF2-GTP-Met-tRNA-Komplexes an die ribosomale 40S-Untereinheit; verhindert die vorzeitige Bindung der ribosomalen 60S-Untereinheit an den Komplex
2	Bestandteil des ternären Komplexes mit GTPase-Aktivität; nach Hydrolyse des gebundenen GTP kann sich der 80S-Initiationskomplex bilden
2B	katalysiert den Austausch des an eIF2 gebundenen GTP gegen GDP
3	Bestandteil des 43S-Präinitiationskomplexes; unterstützt die Bindung dieses Komplexes an die mRNA (über eIF4G)
4A	ATP-abhängige RNA-Helikase; Bestandteil von eIF4F
4B	Kofaktor von eIF4A
4E	Bestandteil von eIF4F; erkennt und bindet das Cap-Nukleotid am 5'-Ende der mRNA
4F	bestehend aus eIF4E, eIF4A und eIF4G; entwindet das 5'-Ende der mRNA und unterstützt die mRNA-Bindung an den Komplex
4G	Bestandteil von eIF4F; Kofaktor von eIF4A; durch Interaktion mit PABP kommt es zur Zirkularisierung der mRNA; Bindung an eIF3
4H	Kofaktor von eIF4A
5	stimuliert die GTPase-Aktivität von eIF2 nach Erreichen des Start-Codons, wodurch sich die ribosomale 60S-Untereinheit anlagern kann
5B	stimuliert die GTPase-Aktivität des eIF2
PABP	Poly(A)-bindendes Protein; Interaktion mit eIF4G

Tabelle 1.2.1 Eukaryotische Initiationsfaktoren der Translation. Zusammengefasst aus Hellen und Samow, 2001; Marintchev und Wagner, 2004; Jackson *et al.*, 2010.

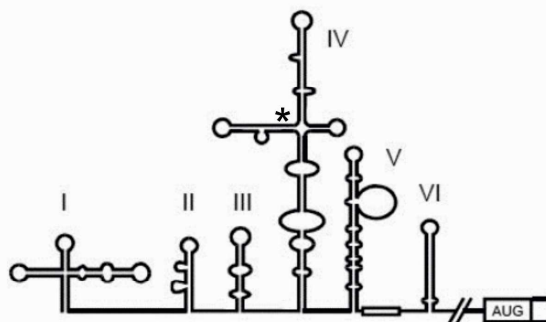
Nach Dissoziation der Initiationsfaktoren kann die ribosomale 60S-Untereinheit binden, was den 80S-Translationskomplex vollständig und funktionsfähig macht. Es folgt die Elongationsphase der Translation, in der die mRNA abgelesen und das Protein durch den Translationsprozess gebildet wird (Merrick, 1992). Durch Bindung des Poly(A)-Bindeproteins PABP (*engl. poly(A)-binding protein*) an den Poly(A)-Schwanz der mRNA und den Faktor eIF4G kommt es zu einer Zirkularisierung der mRNA (Gale *et al.*, 2000), was die Translationseffizienz erhöhen soll, da die Ribosomen schneller reinitiiieren können (Jacobson, 1996).

1.2.2 Die IRES-vermittelte Initiation der Translation

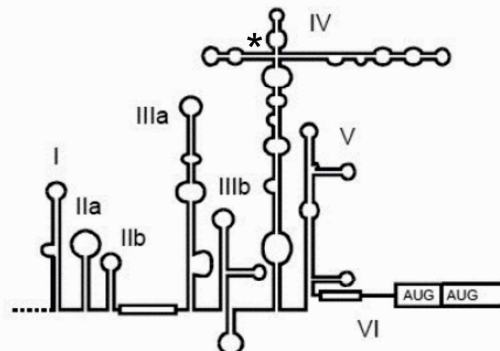
Anders als die eukaryotische mRNA mit 5'-cap-Struktur und 3'-Poly(A)-Schwanz wird die HCV-RNA zwar auch am 5'- bzw. 3'-Ende von ausgeprägten Sekundärstrukturen flankiert (siehe Abbildung 1.1.2), diese sind aber strukturell unterschiedlich im Vergleich zu den eben genannten Sekundärstrukturen der eukaryotischen mRNA. Da die 5'-Kappe und der 3'-Poly(A)-Schwanz der mRNA wesentlich an der Initiation der Translation beteiligt sind (Muthukrishnan *et al.*, 1975; Furuichi und Shatkin, 2000; Sachs und Varani, 2000), muss die HCV-RNA über andere Mechanismen die Translation initiieren. Wesentlich an der Aufklärung dieses alternativen Mechanismus war die Entdeckung der internen Ribosomen Eintrittsstelle (*engl.* internal ribosome entry site, IRES) durch die Arbeitsgruppe um E. Wimmer im Jahre 1988 (Jang *et al.*, 1988) anhand des Encephalomyokarditis-Virus (EMCV), welcher in die Familie der Picornaviridae klassifiziert wird.

Picornaviridae

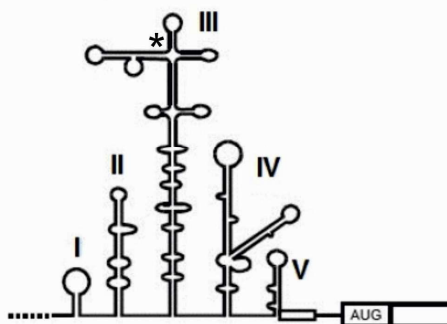
I. Entero-/Rhinoviruses



III. Hepatitis A Virus



II. Cardio-/Aphthoviruses



Flaviridae

IV. Hepatitis C Virus Pestivirus

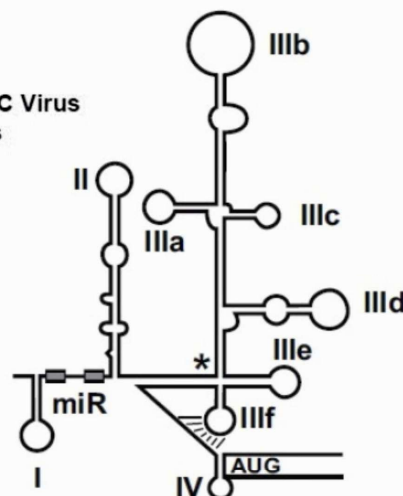


Abb. 1.2.2 Beispiele der verschiedenen IRES-Elemente. Dargestellt sind die IRES-Elemente Typ I (anhand der Entero-/Rhinoviruses), Typ II (Cardio-/Aphthovirus), Typ III (Hepatitis A Virus) sowie Typ IV (Hepatitis C Virus/Pestivirus). Die Stem-Loops sind mit römischen Zahlen beziffert, mit einem Sternchen (*) markiert ist jeweils die strukturelle Ähnlichkeit zur tRNA. Beim IRES-Element Typ IV (Hepatitis C Virus) sind zudem die bekannten miR-122-Bindestellen eingezeichnet (graue Kästen). *Modifiziert aus Niepmann, 2009.*

Im selben Jahr wurde zudem eine ähnliche 5'-Struktur der RNA des Poliovirus identifiziert (Pelletier und Sonenberg, 1988). Es folgte die Entdeckung weiterer 5'-UTRs innerhalb der RNA des Maul-und Klauenseuche-Virus (*engl.* foot-and-mouth disease virus, FMDV), des humanen Rhinovirus (*engl.* human rhino virus, HRV), des Hepatitis A Virus (HAV) und nicht zuletzt des Hepatitis C Virus (Kuhn *et al.*, 1990; Borman und Jackson, 1992; Brown *et al.*, 1994; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Baird *et al.*, 2011).

Die bisher bekannten IRES-Elemente lassen sich in 4 Typen einteilen (siehe Abbildung 1.2.2). Bei allen Typen auffällig ist das Vorhandensein des vierstrahligen Knotenpunktes, der an die Sekundärstruktur der tRNA erinnert (Niepmann, 2009), auch wenn sich die Struktur der HCV-IRES deutlich von den restlichen Typen I – III unterscheidet. Anzumerken ist, dass innerhalb der 5'-UTR der HCV-RNA nur die Stem-Loops II-IV sowie die ersten Nukleotide der Core-kodierenden Sequenz als HCV-IRES bezeichnet werden, der Stem-Loop I ist hingegen ausschließlich an der HCV-Replikation beteiligt (Niepmann, 2009).

Während die IRES-Elemente der Picornaviren für die Initiation der Translation weiterhin zelluläre Initiationsfaktoren benötigen (Pestova *et al.*, 1996), kann der

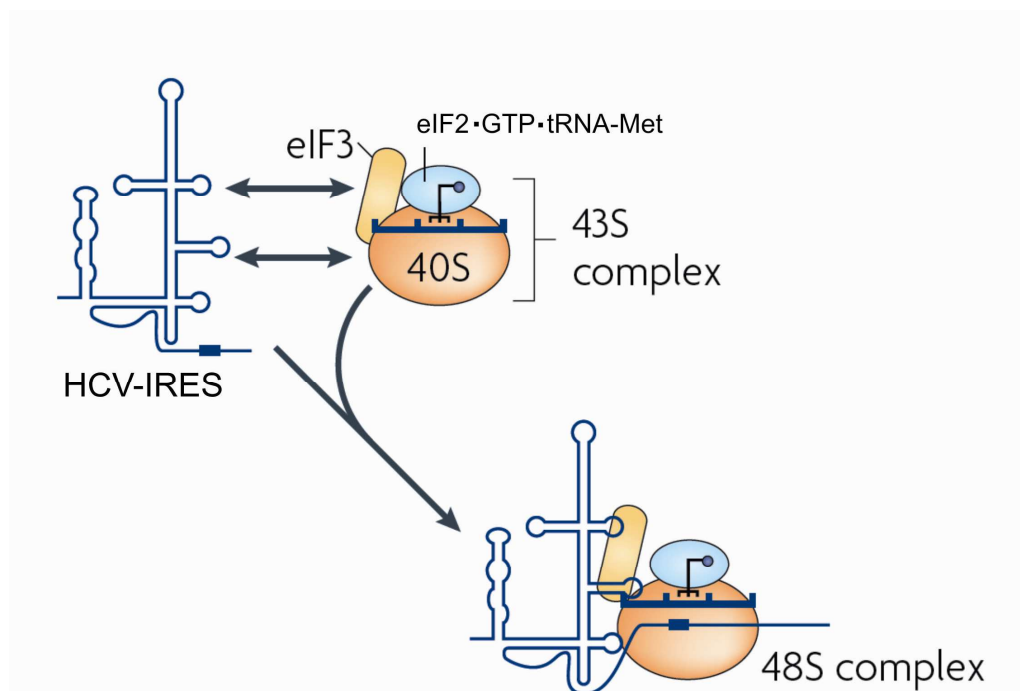


Abbildung 1.2.2.1 IRES-vermittelte Initiation der HCV-Translation. Dargestellt ist die Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes sowie des 48S-Komplexes ohne Beteiligung der eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B sowie eIF4F. Durch die Faktoren eIF3 und eIF2 kann der Komplex ohne weitere Faktoren direkt an die HCV-RNA binden. *Modifiziert aus Jackson et al., 2010.*

Pseudoknoten innerhalb der HCV-IRES direkt ribosomale Untereinheiten binden, was eine Bindung an die ribosomale 40S-Untereinheit ohne jeglichen Initiationsfaktor ermöglicht (Pestova *et al.*, 1998; Spahn *et al.*, 2001; Kieft *et al.*, 2001). Möglich ist jedoch eine Interaktion des Stem-Loop III mit dem Faktor eIF3 (siehe Abbildung 1.2.2.1), wodurch die Bindung der ribosomalen Untereinheit mit der HCV-RNA unterstützt wird (Kieft *et al.*, 2001; Sizova *et al.*, 1998; Buratti *et al.*, 1998; Martinez-Salas *et al.*, 2012). Nach Hydrolyse des an den Faktor eIF2 gebundenen GTPs kann sich die 60S-Untereinheit des Ribosoms anlagern, wodurch es zur Ausbildung des funktionsfähigen 80S-Translationskomplexes kommt (Fraser *et al.*, 2007).

1.2.3 Interaktion der HCV-RNA mit weiteren zellulären Proteinen

Obwohl die HCV-IRES unabhängig von weiteren Faktoren die 40S-Untereinheit des Ribosoms binden kann (Pestova *et al.*, 1998; Spahn *et al.*, 2001), sind mittlerweile zahlreiche Proteine bekannt, die an der IRES-vermittelten Initiation der HCV-Translation beteiligt sind. Diese sogenannten ITAFs (*engl.* IRES trans-acting factors) können Einfluss auf die HCV-Translation haben. Tabelle 1.2.3 listet die bisher bekannten ITAFs jeweils mit ihrer Funktion und deren Einfluss auf die HCV-Translation auf. Bisher ist noch vollkommen ungeklärt, nach welchem zeitlichen Ablauf bzw. innerhalb welchen Zusammenspiels diese Faktoren mit der HCV-RNA interagieren.

ITAF	Charakterisierung	Einfluss auf HCV-Translation
La Protein	beteiligt an der Prozessierung eukaryotischer Vorläufer-tRNAs (Maraia und Lamichhane, 2011); bindet die HCV-RNA im Bereich des Start-Codons (Ali und Siddiqui, 1997); vermittelt den Kontakt des Proteins S5 der 40S-Untereinheit des Ribosoms mit dem Stem-Loop IV der HCV-IRES (Pudi <i>et al.</i> , 2004)	stimulierend (Ali und Siddiqui, 1997)
NSAP1 ¹	fördert die korrekte Positionierung der ribosomalen 40S-Untereinheit auf das HCV-Start-Codon (Park <i>et al.</i> , 2011); beteiligt an der HCV-Replikation (Liu <i>et al.</i> , 2009)	stimulierend (Kim <i>et al.</i> , 2004)
hnRNP L ²	interagiert mit HCV-Sequenzen in der Nähe des 3'-Endes der HCV-IRES (Hahm <i>et al.</i> , 1998)	stimulierend (Hahm <i>et al.</i> , 1998)
hnRNP D ³	bindet Stem-Loop II der HCV-IRES (Paek <i>et al.</i> , 2008) Interagiert mit hnRNP L (Kim <i>et al.</i> , 2000)	stimulierend (Paek <i>et al.</i> , 2008)
IGF2BP1 ⁴	assoziiert mit 48S-/80S-Translationskomplexen (Weinlich <i>et al.</i> , 2009)	stimulierend (Weinlich <i>et al.</i> , 2009)
Gemin5	interagiert mit dem Stem-Loop III der HCV-IRES (Pacheco <i>et al.</i> , 2009)	hemmend (Pacheco <i>et al.</i> , 2009)
LSm1-7 ⁵	interagiert mit Stem-Loop III der HCV-IRES (Scheller <i>et al.</i> , 2005)	stimulierend (Scheller <i>et al.</i> , 2005)
PTB ⁶	involviert in der Regulation des Splicings (Xue <i>et al.</i> 2009)	nicht eindeutig geklärt (Gosert <i>et al.</i> , 2000; Tischendorf <i>et al.</i> , 2004)

Tabelle 1.2.3 Zelluläre Proteine, die mit der HCV-IRES interagieren. Aufgelistet sind bisher bekannte Proteine, die im Rahmen der IRES-vermittelten HCV-Translation mit der HCV-IRES interagieren und Einfluss auf die Translationseffizienz haben. Bisher ungeklärt ist der genaue Mechanismus, wie diese Faktoren ihren Einfluss auf die HCV-Translation ausüben.

¹mice minute virus NS1-associated protein 1; ²heterogeneous nuclear ribonuclearprotein L; ³heterogeneous nuclear ribonuclearprotein D; ⁴insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1; ⁵like Sm protein; ⁶polypyrimidine tract-binding protein

1.3 microRNAs

Als microRNAs (auch miRNAs oder miRs genannt) werden kleine RNA-Moleküle mit Einfluss auf die Genaktivität und einer Länge von etwa 22 Nukleotiden bezeichnet. Erstmals wurden solch kleine RNA-Moleküle bei dem Fadenwurm *C. elegans* dokumentiert und deren Funktion analysiert (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000; Lee und Ambros, 2001).

Bisher sind mindestens 800 menschliche Gene bekannt, die für microRNAs kodieren und die Aktivität von mehr als 5300 Genen regulieren (Lewis, Burge und Bartel, 2005; Xie *et al.*, 2005; Bartel, 2009). Beachtlich ist, dass Viren im Rahmen ihrer Überlebensstrategie von der Existenz dieser kleinen Moleküle Gebrauch machen können. Zudem ist nachgewiesen, dass ein Teil des Genoms einiger Viren für eigene miRNAs kodiert (Cullen, 2006).

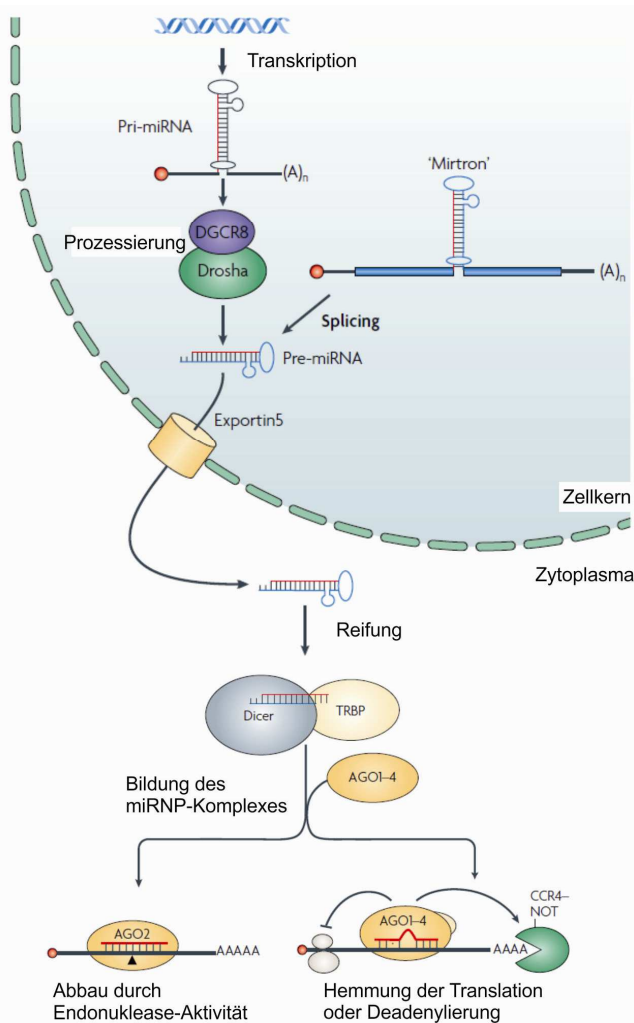
miRNAs regulieren die eukaryotische Genaktivität mittels posttranskriptioneller Modifizierung (Filipowicz *et al.*, 2008; Fabian *et al.*, 2010), indem sie über Basenpaarungen mit der Ziel-mRNA interagieren.

1.3.1 Biogenese und Funktion

microRNAs werden aus Vorläufermolekülen (*engl.* primary-miRNAs oder pri-miRNAs) hergestellt, welche durch Transkription einer mRNA oder als Teil eines Introns Proteinkodierender RNA-Polymerase-II-Transkripte entstehen (Filipowicz *et al.*, 2008). Die pri-miRNAs werden im Zellkern durch die Endonuklease Drosha und deren Co-Faktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) zu etwa 70 Nukleotide langen pre-miRNAs prozessiert (Du und Zamore, 2005; Bushati und Cohen, 2007; Rana, 2007; Peters und Meister, 2007). Zudem kodieren einige Introns für sogenannte „Mirtrons“, welche durch Splicing direkt zu pre-miRNAs prozessiert werden (Ruby *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2007; Berezikov *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2009) und die Drosha/DGCR8-Prozessierung damit umgehen. Die pre-miRNAs werden anschließend durch das Transportprotein Exportin-5 ins Zytoplasma transportiert (Lund *et al.*, 2004), wo sie durch den Komplex aus der Endoribonuklease Dicer und dem Protein TRBP (*engl.* HIV transactivating response RNA binding protein) gespalten werden (Zhang *et al.*, 2004; Du und Zamore, 2005). Diese Modifizierung der miR-Vorläufer resultiert in partiell doppelsträngigen miR-Duplexen mit einer Länge von ungefähr 22 Basenpaaren mit 3'-Überhängen. Der miR-Doppelstrang wird aufgetrennt, der sog. Guide-strand in

dem sogenannten microRNA-Protein-Komplex (miRNP-Komplex) oder RISC-Komplex (*engl.* miRNA-induced silencing complex) gebunden, während der sog. Passenger-strand verworfen wird. Am miRNP-Komplex sind Argonaute (Ago)-Proteine beteiligt (Peters und Meister, 2007), welche die microRNA an ihrem 3'- und 5'-Ende binden (MacRae *et al.*, 2008; Jinek und Doudna, 2009) und so die sog. Seed-Sequenz der miR für die Bindung an die Zielsequenz der mRNA exponieren. Dabei interagiert das 3'-Ende der miR mit der sogenannten PAZ-Domäne des Argonaute-Proteins, das 5'-Ende der miR wird zwischen MID- und PIWI-Domäne desselben fixiert (Peters und Meister, 2007; Jinek und Doudna, 2009), um die Bindungssequenz (sog. „seed“-Sequenz, Nukleotid 2-8) des 5'-Endes der microRNA zu exponieren, welche daraufhin eine Basenpaarung mit der Ziel-mRNA eingehen kann (Parker *et al.*, 2005; Ameres *et al.*, 2007). Bisher konnten Ago1, Ago2, Ago3 sowie Ago4 als Bestandteil der miRNP-Komplexe nachgewiesen werden (Tolia *et al.*, 2007; Hutvagner *et al.*, 2008).

Abb. 1.3.1 Biogenese und Funktion der microRNAs. Vorläufermoleküle der microRNAs, sog. pri-miRNAs, werden durch Transkription von unabhängigen miR-Genen hergestellt. Die pri-miRNAs weisen eine Haarnadelstruktur auf und werden mittels der Endonuklease Drosha und deren Co-Faktor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) zu pre-miRNAs mit einer ungefähren Länge von 70 Nukleotiden prozessiert. Alternativ werden sogenannte „Mirtrons“ mittels Splicing von Introns hergestellt, die ebenfalls als pre-miRNAs bezeichnet werden. Die pre-miRNAs werden durch das Transportprotein Exportin5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert und dort durch die Proteine Dicer und TRBP (HIV transactivating response RNA binding protein) in etwa 22 Nukleotid lange miRNA-Duplexe mit 3'-Überhang prozessiert. Die miRNA-Duplexe werden anschließend entwunden und der Mutterstrang mit dem 5'- und 3'-Ende in einem Argonaute-Protein gebunden, was die sogenannte „seed“-Region, also die potentielle Bindestelle der microRNA zur Ziel-mRNA, exponiert. Bindet eine microRNA an eine Ziel-mRNA, so resultiert in Abhängigkeit vom beteiligten Ago-Protein entweder ein Abbau über Endonuklease-Aktivität (Ago2), die Translation wird gehemmt, oder es kommt zu einer Deadenylierung der mRNA (Ago1-4). *Modifiziert aus Filipowicz *et al.*, 2008.*



Sicher ist aber auch, dass der miRNP-Komplex eine Vielzahl weiterer, teilweise noch nicht identifizierter Proteine enthält (Höck *et al.*, 2007). Der Komplex bindet vornehmlich an Sequenzen innerhalb der 3'-UTR der Ziel-mRNA, und es resultiert normalerweise je nach Bindungsqualität ein Abbau der mRNA (Hutvagner *et al.*, 2002; Yekta *et al.*, 2004; Nilsen, 2007), eine Repression der Translation der gebundenen Ziel-mRNA (Chen, 2004; Doench *et al.*, 2003; Doench *et al.*, 2004; Saxena *et al.*, 2003) oder eine Deadenylierung der Ziel-mRNA (Filipowicz *et al.*, 2005; Filipowicz *et al.*, 2008). Anzumerken ist, dass Ago2 als einziges Argonaute-Protein am Vorgang der RNA-Interferenz (RNAi) beteiligt ist, welche durch endonukleolytische Aktivität die Ziel-mRNA direkt abbaut (Liu *et al.*, 2004; Sontheimer, 2005). Beobachtet wird eine Lagerung der translationsgehemmten mRNA in sogenannten P-Körpern (*engl.* p-bodies) (Parker *et al.*, 2007; Eulalio *et al.*, 2007). Während man zunächst davon ausgegangen ist, dass microRNAs die Translation von mRNAs nur hemmen, ist heute belegt, dass die Interaktion der microRNAs mit mRNAs auch zu einer Stimulation der Translation führen kann (Vasudevan *et al.*, 2007; Henke *et al.*, 2008; Orom *et al.*, 2008).

1.3.2 Die leberspezifische miR-122

Die miR-122 wird bevorzugt in Hepatozyten exprimiert (Sempere *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Fu *et al.*, 2005; Landgraf *et al.*, 2007) und stellt dort mit einem Gesamtanteil von 70 % aller dort vorkommenden microRNAs deren größte Fraktion dar (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004). Dadurch ist sie diejenige microRNA, welche im Menschen am höchsten in einem Gewebe konzentriert ist (Chang *et al.*, 2004). Ihre Existenz konnte bis 2011 in insgesamt 18 verschiedenen Wirbeltieren nachgewiesen werden (Kozomora *et al.*, 2011).

Die miR-122 ist beteiligt an der HCV-Replikation (Jopling *et al.*, 2005) und der HCV-Translation (Henke *et al.*, 2008; Niepmann, 2009; Jangra *et al.*, 2010; Roberts *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011). Nach Bindung der miR-122 an die HCV-RNA kommt es zu einer Stimulation der HCV-Translation, vornehmlich während der Initiation (Henke *et al.*, 2008). Dabei kann eine Stimulierung der HCV-Translation durch miR-122 in Hepatozyten in den Zellzyklusphasen G0, G1 und G2/M nachgewiesen werden (Fehr *et al.*, 2012). Ein Effekt auf die Elongation der RNA-Synthese während der HCV-Replikation wurde bisher nicht beobachtet (Villanueva *et al.*, 2010).

Diese Tatsache könnte neben den Oberflächen-Rezeptoren mit zum hepatischen Gewebstropismus des Hepatitis C Virus beitragen. Untermauert wird diese Vermutung

durch die Tatsache, dass die miR-199a die Replikation von HCV durch Bindung an den Stem-Loop II der HCV-5'-IRES reprimiert (Murakami *et al.*, 2009), in der Leber der Gehalt an miR-199a jedoch sehr gering ist, sodass eine Repression durch miR-199a in manchen extrahepatischen Geweben, nicht aber in Hepatozyten den Lebertropismus von HCV indirekt unterstützt.

Bisher konnten drei Zielsequenzen innerhalb der UTRs des HCV-Genoms nachgewiesen werden, die komplementär zur Bindungssequenz der miR-122 sind (siehe schwarze Kästen Abb. 1.1.2). Zwei befinden sich zwischen Stem-Loop I und Stem-Loop II der HCV-5'-UTR, eine weitere innerhalb der Variablen Region im Bereich der HCV-3'-UTR (Jopling *et al.*, 2005 und 2008). Nach aktuellem Wissensstand konnte der Mechanismus der Stimulierung der HCV-Translation noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Aktuell sind bereits verschiedene physiologische Ziele der miR-122 bekannt. So konnte nachgewiesen werden, dass die miR-122 an die 3'-UTR der CAT-1 (Cationic amino acid transporter 1)-mRNA bindet und hier zu einer Hemmung der Translation führt (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Als weitere Ziele konnten die mRNAs kodierend für die Aldolase A oder das Gen Ndr3 (N-myc downstream regulated gene 3) identifiziert werden (Fan *et al.*, 2011; Jopling, 2012). Des Weiteren wird ein Effekt der miR-122 auf den Cholesterinspiegel im Humanplasma beobachtet (Esau *et al.*, 2006). Vermutet wird auch eine Aktivität als Tumorsuppressor (Bai *et al.*, 2009), ein geringerer Gehalt an miR-122 in Hepatozyten bei einem hepatozellulären Karzinom korreliert mit einer schlechteren Prognose (Kutay *et al.*, 2006; Coulouarn *et al.*, 2009).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Bekannt ist, dass die Region um die zweite miR-122-Bindestelle innerhalb der 5'-UTR der HCV-RNA unter allen HCV-Isolaten hochkonserviert ist. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit sich die beobachtete Stimulierung der HCV-Translation durch miR-122 verändert, wenn sich der Abstand der zweiten miR-122-Bindestelle zum Stem-Loop II innerhalb der HCV-IRES vergrößert.

In vitro wurde bereits durch vorangehende Untersuchungen mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation aufgezeigt, dass die miR-122 Einfluss auf die Bildung von Translations-Initiationskomplexen nimmt. Im zweiten Teil der Arbeit sollte daher in einem ersten Schritt diese Methode für HuH-7-Zellen optimiert werden.

Anschließend soll untersucht werden, ob mit dieser Methode ein Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe nachgewiesen werden kann.

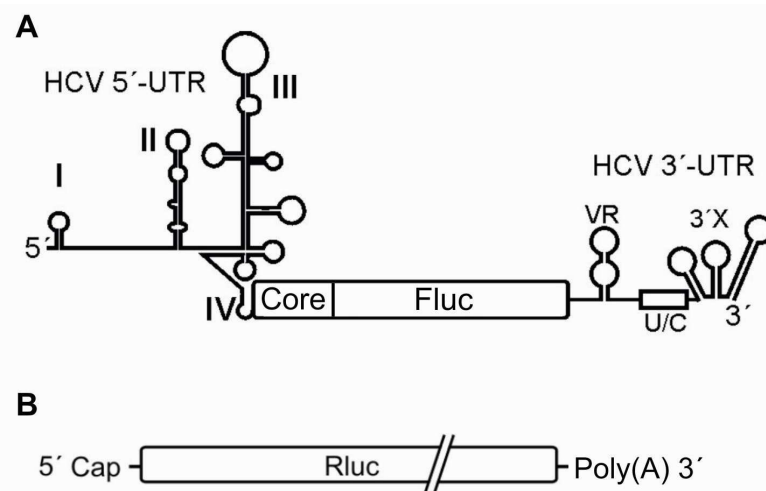
2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Translationseffizienz von verschiedenen HCV-Insertions-Mutanten

Verschiedene Arbeitsgruppen haben durch Sequenzvergleiche belegt, dass die Region um die zweite microRNA-122-Bindestelle im Bereich der 5'-UTR der HCV-RNA eine geringe Variabilität innerhalb der HCV-Subtypen aufweist (Hraber *et al.*, 2006; Simmonds *et al.*, 2004; siehe Abbildung 3.1.1). In diesem Teil der Arbeit wird daher untersucht, inwieweit diese hochkonservierte Region eine Rolle bei der Translation der HCV-RNA spielt beziehungsweise welchen Einfluss diese Region auf die Stimulierung der Translation durch microRNA-122 besitzt. Dazu wurden verschiedene HCV-Insertions-Mutanten in Zellen transfiziert, um deren Translationseffizienz im Vergleich zur HCV-Wildtyp-RNA abbilden zu können.

2.1.1 Konstrukte

Die transfizierten Reporterkonstrukte wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Die entsprechenden DNA-Matrizen für die Transkription wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase-chain-reaction*, PCR) auf Grundlage der jeweiligen Plasmide (Plasmidkarten siehe Anhang) generiert. Die so entstandene HCV-RNA



enthält die 5'-untranslatierte Region (engl. *5'-untranslated region*, 5'-UTR) des HCV-Genoms mit den Stamm-Schleifen (engl. *stem loops*) I – IV der HCV-internen ribosomalen Eintrittsstelle (engl. *internal ribosome entry site*, IRES), die für die *Firefly*-

Abb. 2.1.1 Verwendete Konstrukte. (A) HCV-Reporterkonstrukt mit partieller Core-Sequenz und *Firefly*-Luziferase, flankiert von HCV-5'-UTR und HCV-3'-UTR. (B) Co-Reporter mit 5'-Cap, *Renilla*-Luziferase und Poly(A)-Schwanz.

Luziferase (FLuc) kodierende Sequenz sowie die authentische und exakte 3'-untranslatierte Region (engl. *3'-untranslated region*, 3'-UTR) des HCV-Genoms, die die IRES-vermittelte Translation des HCV-Genoms effizient stimuliert (Song *et al.*, 2006; Bradrick *et al.*, 2006). Der N-terminale Anteil der Core-Protein-kodierenden Sequenz wurde jeweils im Konstrukt belassen, da diese an der internen Initiation der Translation beteiligt ist (Reynolds *et al.*, 1995).

Neben einem WST-1-Assay zur Normalisierung der Ergebnisse wurde in manchen Experimenten eine Co-Reporter-mRNA mit transfiziert. Diese verwendete Co-Reporter-mRNA kodiert für die *Renilla*-Luziferase (RLuc) und wurde in Anwesenheit von capping-Nukleotiden *in vitro*-transkribiert und anschließend mit einer Poly(A)-Polymerase am 3'-Ende polyadenyliert.

2.1.2 Transfektion in Zellen

Um den Einfluss der hochkonservierten Region der 5'-UTR der HCV-RNA zu untersuchen, wurden auf Grundlage des HCV-Reporterkonstrukts verschiedene Mutanten hergestellt und diese in Zellen transfiziert. Um auf die durch miR-122 gesteigerte Effizienz der Translation der Reporter-RNA indirekt schließen zu können, wurde im Anschluss an die Transfektion die Aktivität der von dem integrierten FLuc-Reporter gen exprimierten Luziferase gemessen.

Sämtliche Reporterkonstrukte wurden durch *in vitro*-Transkription der entsprechenden DNA-Matrize hergestellt. Die entstehende RNA enthält jeweils die 5'-UTR der HCV-IRES mit den beiden miR-122-Bindestellen, die partielle Core-Sequenz, die für die *Firefly*-Luziferase-kodierende Sequenz sowie die 3'-UTR. Neben dem HCV-Wildtyp-Reporterkonstrukt wurden drei HCV-Insertions-Mutanten hergestellt, die zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der 5'-UTR innerhalb der HCV-IRES Nukleotid-Insertionen der Länge 5, 10 und 20 aufweisen (siehe Abbildung 2.1.3 A).

Um die Transfektionsergebnisse zu normalisieren, wurde jeweils ein WST-1-Assay im Anschluss an die Transfektion angefertigt, um die FLuc-Expression des HCV-Konstrukts auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen normalisieren zu können. Die leberspezifische miR-122 stimuliert intrazellulär die Translation der Hepatitis-C-Virus-RNA (Henke und Goergen *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2011). Um optimale Effekte der Interaktion der miR-122 mit der HCV-RNA abbilden zu können, wurde zuerst untersucht, bei welcher Menge an miR-122 die maximale Stimulierung der Translation erreicht wird. Hierzu wurden konstante Mengen an HCV-Wildtyp-Reporter-RNA mit verschiedenen Mengen an miR-122 transfiziert und die Stimulierung

der Translation indirekt über die *Firefly*-Luziferase bestimmt. Wie Abbildung 2.1.2 verdeutlicht, wird bei Zugabe von 400 ng miR-122 die höchste Translationsstimulierung erreicht. Für sämtliche weiteren Transfektionsergebnisse wurden daher jeweils 400 ng miR-122 eingesetzt.

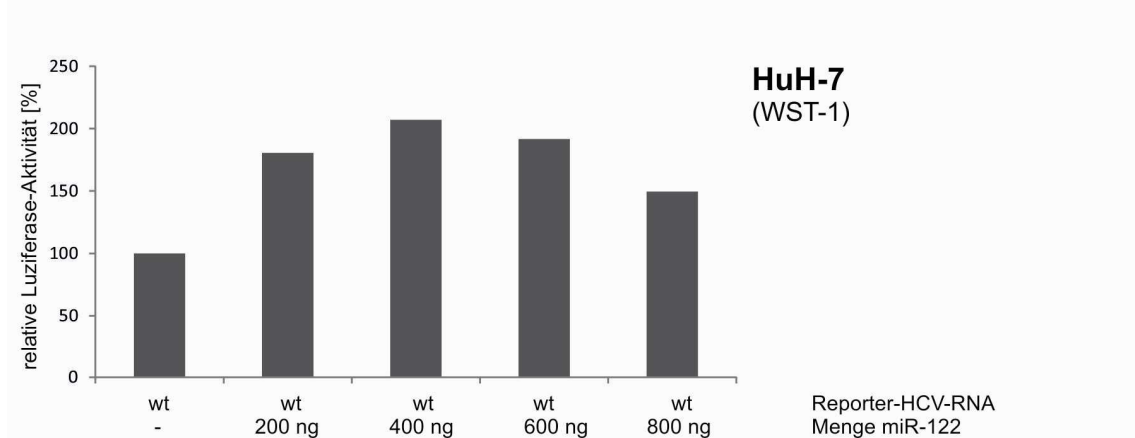


Abb. 2.1.2 Durch Verwendung von 400 ng miR-122 wird in HuH-7-Transfektionen die stärkste Stimulation der HCV-Translation erreicht.

Titriert wurden pro Vertiefung ("Well"; 1,9 cm²; ca. 80 % konfluente Zellen) jeweils verschiedene Mengen an miR-122 (0, 200, 400, 600, 800 ng) als Zugabe zu HuH-7-Transfektionen mit 400 ng HCV-Wildtyp-RNA. Das Messergebnis des Ansatzes ohne Zugabe von miR-122 wurde gleich 100 %

2.1.2.1 Vergleich der miR-122-gesteigerten Translationseffizienz in HuH-7-Zellen

Die miR-122 stimuliert intrazellulär die HCV-Translation unter anderem als Bestandteil des RNA-induced silencing complex (RISC). Der RISC ist ein Protein-Komplex, in dem auch das Protein Argonaute 2 (Ago2) als essentieller Bestandteil nachgewiesen werden konnte (Filipowicz *et al.*, 2008). Beide Faktoren scheinen synergistisch den intrazellulären Abbau der HCV-RNA zu verhindern (Shimakami *et al.*, 2011) sowie die Translation des HCV-Genoms zu stimulieren (Wilson *et al.*, 2011; Roberts *et al.*, 2011). Dazu benötigt die miR-122 die beiden konservierten Bindestellen im Bereich der 5'-UTR des HCV-Genoms (Jopling *et al.*, 2005; Jopling *et al.*, 2008). Die exakte Zusammensetzung des RISC ist weitgehend unbekannt, jedoch scheint für die Stimulierung der HCV-Translation die Bedingung erfüllt sein zu müssen, dass miR-122 in unmittelbarer Nähe zur HCV-IRES bindet, da der Bereich um die zweite miR-122-Bindestelle der HCV-IRES unmittelbar voransteht und hochkonserviert ist (s. Abbildung 3.1.1).

Um dies zu überprüfen, wurden im folgenden Versuch verschiedene HCV-Insertions-Mutanten verwendet, die zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der 5'-UTR innerhalb der HCV-IRES Nukleotid-Insertionen der Länge 5, 10 und 20 aufweisen (Abbildung 2.1.3 A), die den Abstand der zweiten miR-122-Bindestelle zu der HCV-IRES vergrößern. Die HCV-Insertions-Mutanten (bezeichnet als mut_5nt, mut_10nt, mut_20) sowie die HCV-Wildtyp-RNA (bezeichnet als wt) wurden in HuH-7-Zellen transfiziert und die Stimulierung der Translation durch miR-122 indirekt über den integrierten Reporter *Firefly*-Luziferase gemessen.

Für jeden der fünf Versuche wurde unmittelbar vor Transfektion durch *in vitro*-Transkription neue HCV-Reporter-RNA hergestellt und zur Kontrolle auf einem Agarose-Gel durch Elektrophorese aufgetrennt. Abbildung 2.1.3 B zeigt ein Beispiel einer Agarose-Gelelektrophorese nach *in vitro*-Transkription der Insertions-Mutanten sowie des HCV-Reporter-RNA-Wildtyps.

Jeweils 400 ng der hergestellten HCV-Reporter-RNA wurden zusammen mit 400 ng miR-122 oder miR-124 in HuH-7-Zellen transfiziert. Die HuH-7-Zellen wurden am Vorabend des Versuchs ausgesät und erreichten in den Wells am Versuchstag mindestens eine Zelldichte von 80 %. Durch Inkubation über Nacht konnte gewährleistet werden, dass die Zellen im Well genug Zeit zur Adhäsion hatten. Die Inkubationszeit für die Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin™2000 (Invitrogen) betrug 4 Stunden bei 37 °C. Weitere Schritte bis hin zur Messung sind in Kapitel 4.2.4.1 genau erläutert.

Sämtliche angegebenen relativen Werte der *Luziferase*-Aktivität sind auf WST-1 genormt (nähere Erläuterung siehe Kapitel 2.2.1). Zum besseren Vergleich der Translationseffizienz wurde jeweils parallel zu den Transfektionen mit miR-122 ein zweiter Reaktionsansatz mit miR-124 transfiziert. Diese gehirnspezifische microRNA zeigt keinen Einfluss auf die HCV-Translation (Henke und Goergen et al., 2008), wurde jedoch zusätzlich transfiziert, um äquivalente Mengen an transfizierter RNA zu gewährleisten und Transfektionseffekte auszuschließen.

Abbildung 2.1.3 C zeigt, dass mit zunehmender Länge der Nukleotid-Insertionen die Effizienz der Stimulation der Translation durch miR-122 abfällt. Während die HCV-RNA-mut_5nt noch keinen signifikanten Unterschied zur Stimulation der Translation des HCV-RNA-Wildtyps aufweist, zeigen das Reporterkonstrukt HCV-RNA-mut_10nt und HCV-RNA-mut_20nt signifikante Unterschiede in der Translationsstimulierung. Bereits bei einer Insertionslänge von 20 Nukleotiden zeigt sich im Vergleich zum selben Konstrukt mit miR-124 keine Differenz mehr, die Translation der HCV-Reporter-RNA lässt sich also nicht mehr durch die miR-122 stimulieren.

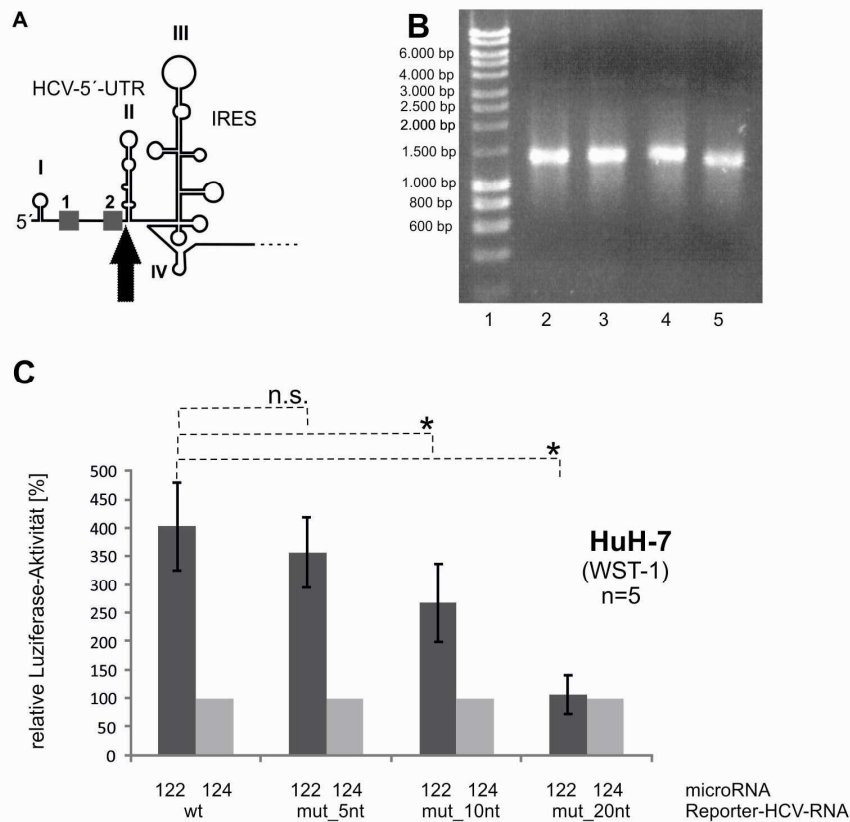


Abb. 2.1.3 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der 5'-UTR der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (*engl.* IRES) reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen. **(A)** In die HCV-Reporter-RNA wurden 5, 10 und 20 Nukleotide (*bezeichnet als* mut_5nt, mut_10nt und mut_20nt) zwischen die zweite miR-122-Bindestelle und die Basis des Stem-Loop II der HCV-IRES eingefügt (*schwarzer Pfeil*), oder die RNA wurde in ihrer Konfiguration belassen (*bezeichnet als* wt). **(B)** Beispiel einer RNA-Agarose-Gelelektrophorese mit den verwendeten HCV-RNAs. Größenstandard HyperLadder I (Bioline) (1), HCV-RNA-mut_5nt (2), HCV-RNA-mut_10nt (3), HCV-RNA-mut_20nt (4), HCV-RNA-wt (5). **(C)** Die relative Translationseffizienz der Wildtyp-RNA sowie der modifizierten RNA bei Zugabe von 400 ng miR-122 pro Well. Die Translationseffizienz der jeweiligen RNA-Konstrukte in Anwesenheit von miR-124 wurde jeweils zum Vergleich auf 100 % genormt. Sämtliche Effekte des HCV-Reporters wurden auf WST-1 normalisiert. Sternchen kennzeichnen die Signifikanzwerte zur Auswertung der statistischen Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der mutierten HCV-RNA (n.s. > 0,05; * < 0,05; ** < 0,01).

Das Tetrazoliumsalz WST-1 (Roche) wurde im oben gezeigten Experiment zu Normalisierungszwecken herangezogen. Durch Umsetzung des Salzes in Formazan wird die Aktivität der intakten zellulären Atmungskette gemessen. Die nach Inkubationszeit photometrisch bei 450 nm gemessene Absorption dient dadurch indirekt der Bestimmung der Zellviabilität. Da diese Normalisierungsmethode jedoch unabhängig von der tatsächlich aufgenommenen Menge an RNA ist, wurde neben dem WST-1-Assay auch eine Reporter-mRNA, kodierend für die *Renilla*-Luziferase, cotransfiziert (Abbildung 2.1.4) und die Aktivität der *Renilla*-Luziferase im Extrakt gemessen. So konnte überprüft und sichergestellt werden, dass die Normalisierung der Ergebnisse auf WST-1 tatsächlich aussagekräftig genug ist, um die Translationseffizienz realitätsgenau abbilden zu können.

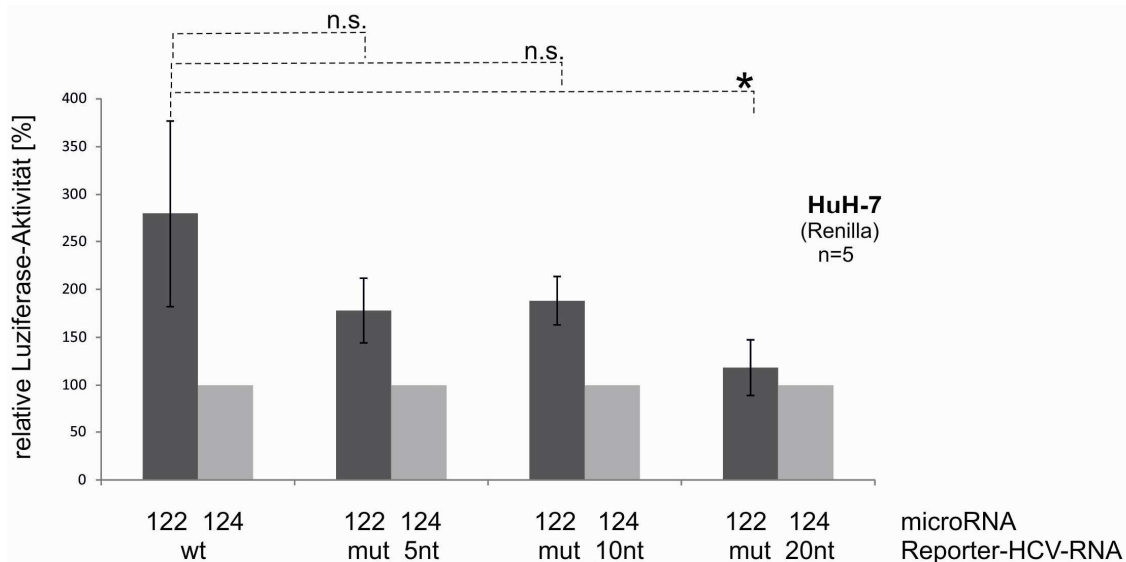


Abb. 2.1.4 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen. Relative Translationseffizienz der HCV-Reporterkonstrukte, normalisiert auf die Expression des Co-Reporters *Renilla*-Luziferase. Die Translationseffizienz der jeweiligen RNA-Konstrukte in Anwesenheit von miR-124 wurde jeweils zum Vergleich auf 100 % genormt.

Auch in diesem Experiment wird die Stimulierung der Translation durch miR-122 mit zunehmendem Abstand der zweiten miR-122-Bindestelle zum Stem-Loop II reduziert und zeigt bei dem Konstrukt HCV-RNA-mut_20nt erneut einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum HCV-RNA-Wildtyp.

Während die Ergebnisse, die mit den HCV-Reporter-RNAs mit 5 und 10 inserierten Nukleotiden erhalten wurden, etwas unterschiedlich im Vergleich zu den auf WST-1 normalisierten Ergebnissen ausfielen, war die Tendenz der Abschwächung der Stimulation der Translation die gleiche. Die Insertion von 20 Nukleotiden machte,

unabhängig von der Methode der Normalisierung, die Stimulation der HCV-Translation durch die miR-122 unmöglich.

2.1.2.2 Vergleich der miR-122-gesteigten Translationseffizienz in HuH-7.5-Zellen

Die vorangehenden Ergebnisse beruhen auf Transfektionen in HuH-7-Zellen. Dies lässt jedoch die Tatsache unbeachtet, dass humanzelluläre Abwehrmechanismen zur Verfügung stehen, die durch Interaktion oder Auslösung von Signalwegen der Infektion durch das Hepatitis C-Virus entgegenwirken. Eindringende virale RNA wird von den Genprodukten RIG-I sowie MDA-5 erkannt (Kato und Takeuchi *et al.*, 2006; Meylan *et al.*, 2006a), worauf es intrazellulär wiederum zu einer gesteigerten Expression von Genen kommt, die für Interferone, speziell IFN- α sowie IFN- β , kodieren (Meylan *et al.*, 2006b; Lau *et al.*, 2008). Da solch mögliche Interaktionen des angeborenen Immunsystems eventuell die Transfektionsergebnisse verzerren können, wurden die Insertions-Mutanten im folgenden Experiment nicht in HuH-7-Zellen, sondern in HuH-7.5-Zellen transfiziert, auch um vergleichen zu können, welchen Einfluss überhaupt das angeborene Immunsystem bei Transfektionen spielt.

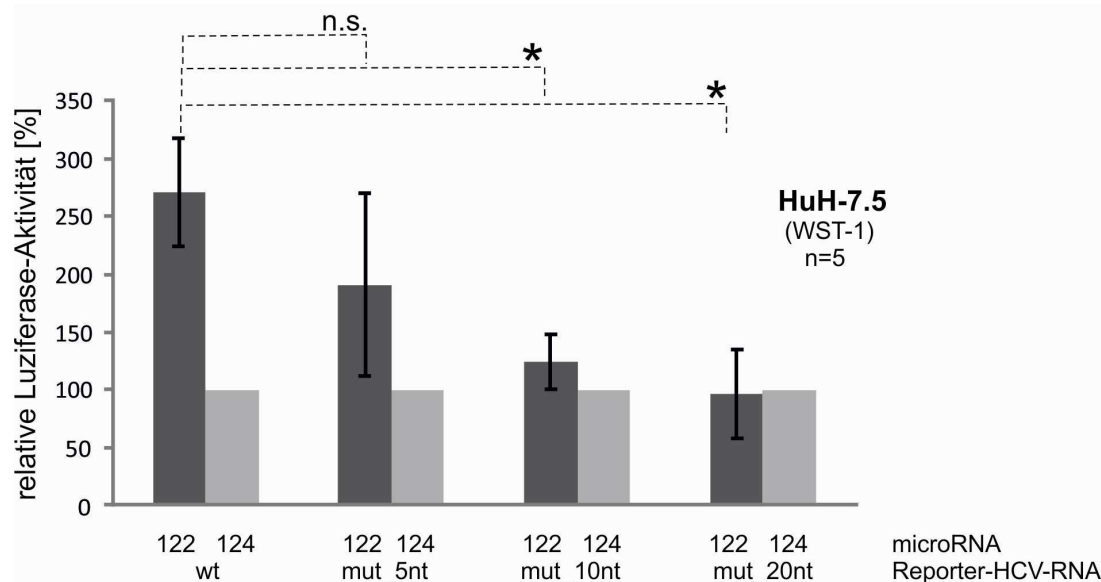


Abb. 2.1.5 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7.5-Zellen. Relative Translationseffizienz der HCV-Reporterkonstrukte (genormt auf WST-1).

HuH-7.5-Zellen sind von HuH-7-Zellen abgeleitet und damit ebenfalls als humane Hepatoma-Zellen charakterisiert (Randall *et al.*, 2003), weisen aber nach Infektion im Vergleich eine höhere Replikationsrate des HCV-Genoms auf (Blight *et al.*, 2002). Dies lässt sich unter anderem dadurch erklären, dass den Zellen die Fähigkeit fehlt, eine funktionierende RIG-I-Helikase zu produzieren, die normalerweise durch Bindung der HCV-RNA die Expression von Genen steigert, die durch Interferone das Immunsystem aktivieren (Saito *et al.*, 2008; Sumpter *et al.*, 2005).

Ähnlich wie bei Transfektionsversuchen in HuH-7-Zellen (s. Abb. 2.1.3 C) wird mit zunehmender Nukleotid-Anzahl zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II die Stimulierung der Translation durch miR-122 reduziert und zeigt bei 10 und 20 Nukleotiden einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum HCV-Wildtyp. So erreicht die HCV-RNA-mut_20nt allenfalls das Niveau der im Vergleich dargestellten Reporter-HCV-RNA mit miR-124. Der stimulierende Effekt durch miR-122 ist also komplett aufgehoben (s. Abbildung 2.1.5).

Im Vergleich zu Transfektionen in HuH-7-Zellen erkennt man auch bei Transfektionen in HuH-7.5-Zellen die Tendenz zur Abschwächung der Stimulation der Translation durch miR-122. Die relative Luziferase-Aktivität liegt, verglichen mit der in HuH-7-Zellen, nicht oberhalb des Niveaus von der in HuH-7.5-Zellen. Dies deutet an, dass in HuH-7-Zellen der Einfluss des Angeborenen Immunsystems auf die Effizienz der HCV-Translation in Versuchen vernachlässigt werden kann.

2.1.2.3 Vergleich der miR-122-gesteigerten Translationseffizienz in HuH-7-Zellen unter Verwendung von (dT)miR-122

Aktivierte Toll-like-Rezeptoren des angeborenen Immunsystems lösen intrazellulär Signalwege aus zur weiteren Aktivierung des Immunsystems. So steigt einerseits die Anzahl der Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen, andererseits steigt die Produktion von verschiedenen Interferonen (Takeda *et al.*, 2005). Speziell die Toll-like-Rezeptor 7/8-abhängige Zytokin-Produktion ist getriggert durch Uridin als Bestandteil von RNA (Sioud, 2006). Gleichzeitig bewirkt ein Austausch von Uridin mit Adenosin eine Aufhebung der Immunreaktion (Sioud, 2010), was anzeigt, das Uridin wesentlich an der spezifischen Erkennung durch TLR-7/8 beteiligt ist (Diebold *et al.*, 2006).

Im folgenden Experiment wurden daher die Insertions-Mutanten in HuH-7-Zellen transfiziert, die beigefügte miR-122 enthielt jedoch nicht Uridin, sondern Desoxy-Thymidin, was die TLR-7/8-vermittelte Immunreaktion aufzuheben vermag (Sioud, 2006).

Es zeigt sich, dass nur die Insertion von 20 Nukleotiden die Stimulierung der HCV-Translation signifikant aufhebt, während die beiden nächst kleineren Nukleotid-Insertionen keinen wesentlichen Unterschied zum HCV-Wildtyp aufweisen.

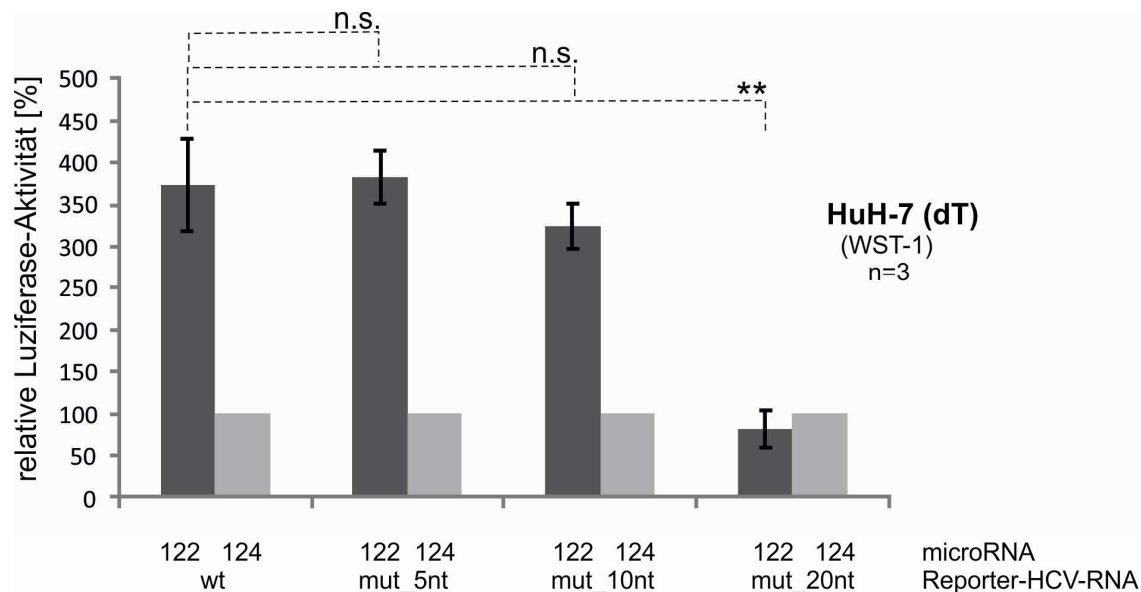


Abb. 2.1.6 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der IRES reduziert das Ausmaß der (dT)-miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen. Relative Translationseffizienz der HCV-Reporterkonstrukte auf WST-1-Messung genormt.

Während in HuH-7-Zellen die Tendenz zur Abschwächung der Stimulierung der Translation durch miR-122 nachgewiesen werden kann, findet sich diese unter Verwendung von (dT)miR-122 in HuH-7-Zellen nur bei der Transfektion der HCV-RNA-mut_20nt. Die RNAs mit 5 und 10 Nukleotid-Insertionen erreichen annähernd das Niveau des HCV-Wildtyps. Der signifikante Unterschied der HCV-RNA-mut_20nt kann an der zusätzlichen Schleife liegen, die durch das Einfügen der 20 Nukleotide innerhalb der Sekundärstruktur neu entsteht (siehe Abbildung 2.2.4).

2.1.3 Fazit

Zur optimalen Abbildung der Stimulierung der Translation durch miR-122 sind pro Transfektionsansatz 400 ng micro-RNA nötig. Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-5'-UTR zeigt eine signifikante Reduktion der Stimulierung der Translation durch miR-122 in HuH-7-Zellen, HuH-7.5-Zellen sowie unter Verwendung von d(T)-miR-122. Die Stimulierung bleibt in sämtlichen Versuchsreihen bei einer Insertion von 20 Nukleotiden komplett aus.

2.2 Technische Diskussion Teil I

2.2.1 Theoretische Stör- und Einflussvariablen bei der Transfektion

Im vorangegangenen Teil dieser Arbeit wird nachgewiesen, dass Nukleotid-Insertionen zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der HCV-IRES die Stimulierung der Translation durch miR-122 reduzieren, die Stimulierung ab einer Insertion von 20 Nukleotiden nicht mehr nachweisbar ist.

Die Effizienz der Translation wurde dabei indirekt über den in die HCV-RNA integrierten Reporter *Firefly*-Luziferase gemessen. Die HCV-RNA war zuvor mittels Lipofektion in HuH-7-Zellen transfiziert worden. Dabei ist stets Lipofectamine® 2000 der Firma Invitrogen als Transfektionsreagenz nach Herstellerprotokoll benutzt worden. Über Interaktionen der RNA mit den Lipidmolekülen des Lipofectamine® 2000 gelangt diese per Endozytose in die HuH-7-Zellen.

Es ist kritisch zu hinterfragen, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse über die Translationseffizienz auch tatsächlich ein realistisches Abbild ergeben, oder ob diese durch diverse Einflüsse bereits während der Transfektion oder nach Transfektion intrazellulär verändert werden können. In einer Untersuchung durch Barreau *et al.* (2006) wird die Lipofektion als Transfektionsmethode kritisch hinterfragt. Zwar konnte nicht nachgewiesen werden, dass lipofizierte, nicht gecappte RNA intrazellulär schneller abgebaut und damit instabiler wird, die Arbeitsgruppe begründet dies jedoch damit, dass der Großteil der transfizierten RNA im Zytosol noch eine gewisse Zeitspanne im Endosom vorliegt beziehungsweise gebunden ist und somit gegen die zellulären Abbaumechanismen geschützt ist. Der weitaus kleinere Teil der transfizierten RNA könne intrazellulär freigesetzt werden und stünde somit für die Translation zur Verfügung. Die Arbeitsgruppe um Barreau rät daher zur Vorsicht in Bezug auf die Lipofektion und empfiehlt diese nur unter Verwendung von einschlägigen Kontrollexperimenten im Anschluss, um die Authentizität der gewonnenen Daten zu verifizieren.

Abbildung 2.2.1 zeigt mögliche Einfluss- und Störvariablen der Transfektion. Lipofectamine™ 2000 besteht aus Lipidmolekülen, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren interagieren und so als Transportvehikel deren intrazelluläre Aufnahme gewährleisten. Die Assemblierung der hier verwendeten HCV-Reporter-RNA mit den Lipidmolekülen nimmt folglich eine gewisse Zeit in Anspruch und wird durch eine ausreichend eingerichtete Inkubationszeit bei Raumtemperatur gewährleistet. In sämtlichen Transfektionsversuchen dieser Arbeit wurde für die

Assemblierung eine Inkubationszeit von 20 min eingehalten, wodurch sichergestellt wird, dass zumindest der überwiegende Teil der RNA für die Lipofektion bereitsteht. Die durch Lipofektion aufgenommene RNA steht intrazellulär allerdings nicht sofort für die Translation zur Verfügung, sondern ist unter Umständen noch zu einem erheblichen Teil in bzw. an Membranstrukturen der endozytischen Vesikel gebunden, was sie zwar Abbauprozessen gegenüber resistent macht (Barreau *et al.*, 2006), allerdings auch bedingt, dass sie nicht translatiert werden kann. Theoretisch kann man also davon ausgehen, dass nur ein relativ geringer Anteil an transfizierter RNA auch wirklich effektiv an der Translation beteiligt ist. Zwar lässt sich dieser relative Anteil auf Grund der Komplexität des Vorgangs nicht erhöhen, aber durch einen höheren absoluten RNA-Einsatz können höhere Mengen an cytosolisch verfügbarer RNA erreicht werden. Aus diesem Grund wurden 400 ng HCV-Reporter-RNA pro Transfektionsansatz eingesetzt, was solide Rohdaten bei der Aktivitätsmessung des verwendeten Reporters sicherstellte. Versuche, bei denen die Messwerte deutlich unter dem Level des Durchschnitts lagen, wurden daher nicht mit in die Wertung einbezogen. Zwar wird in den Ergebnissen nur der relative Wert betrachtet, eine zu deutliche Abweichung der Absolutwerte gegenüber dem Durchschnitt wurde jedoch als generelles Transfektionsproblem gewertet.

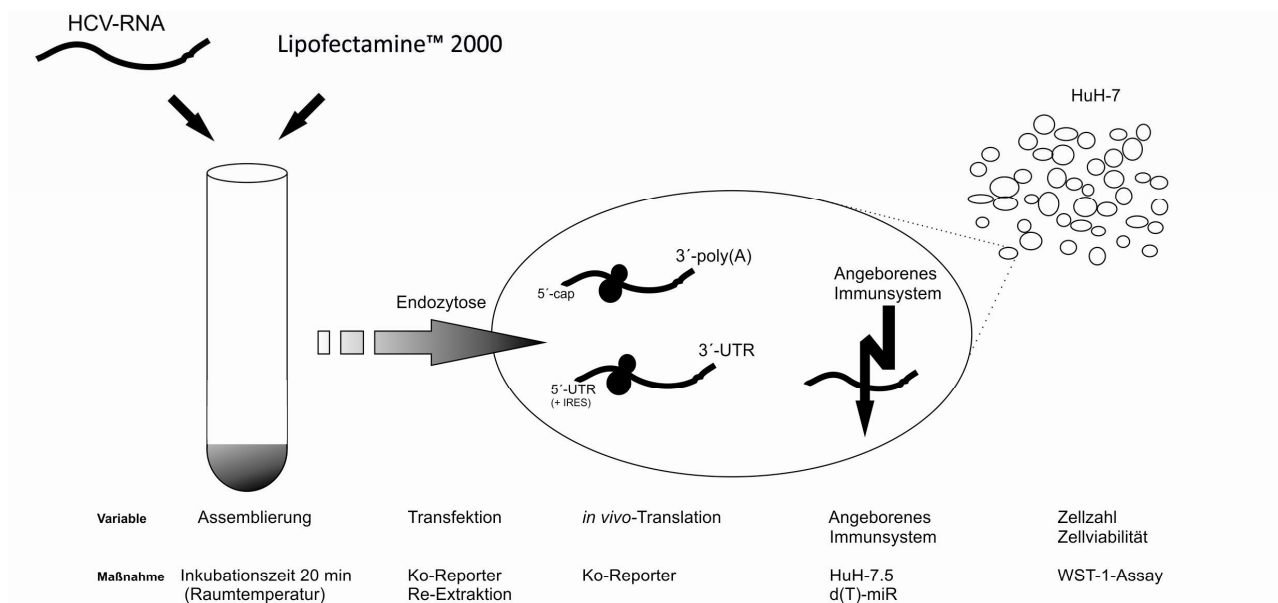


Abb. 2.2.1 Theoretische Stör- und Einflussvariablen bei der Transfektion. Theoretische Variablen, die die Transfektion stören bzw. beeinflussen könnten. Die entsprechende Ebene ist mit der jeweiligen Variablen überschrieben, darunter Maßnahmen, die zur Verhinderung der Stör- und Einflussvariablen in dieser Arbeit Verwendung gefunden haben.

Zur Prüfung, inwieweit transfizierte HCV-Reporter-RNA auch tatsächlich intrazellulär vorliegt bzw. ob sie von Abbauprozessen betroffen ist, lassen sich zudem noch RNA-Stabilitäts-Assays mittels Re-Extraktionen durchführen. Dabei wird radioaktiv markierte HCV-Reporter-RNA in Zellen transfiziert, anschließend die RNA aus dem Lysat isoliert und auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Exposition auf einem Röntgenfilm und anschließender Entwicklung können Aussagen über den Zustand und die Menge der re-extrahierten HCV-Reporter-RNA getroffen werden. Abbildung 2.2.2 zeigt durchgeführte Re-Extraktionen nach Transfektion in HuH-7-Zellen. Die Versuche sind unabhängig voneinander durchgeführt worden, die HCV-Reporterkonstrukte für jeden Versuch durch *in vitro*-Transkription neu hergestellt worden. In jeder Lysat-Probe lässt sich HCV-Reporter-RNA detektieren, jedoch muss festgestellt werden, dass die Menge an HCV-Reporter-RNA innerhalb der Transfektionsansätze zumindest für diese drei Versuche stark variiert. Die sehr variablen Ergebnisse für die Mengen der re-extrahierten HCV-Reporter-RNA, die kein systematisches Muster erkennen lassen, legen allerdings nahe, dass die Re-Extraktion so geringe Mengen an HCV-Reporter-RNA ergab, dass die Ergebnisse methodischen Schwankungen unterliegen und nicht verwertet werden können.

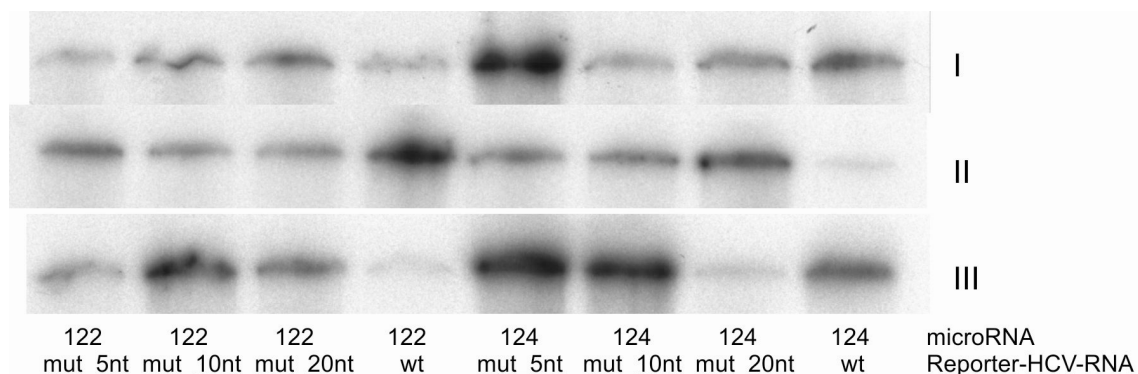


Abb. 2.2.2 Stabilitäts-Assays nach HuH-7-Transfektionen

Polyacrylamid-Gelelektrophorese der ^{32}P -markierten HCV-Reporterkonstrukte nach Transfektion in HuH-7-Zellen zur Kontrolle der RNA-Stabilität. I, II und III kennzeichnen jeweils voneinander unabhängig durchgeführte Transfektionen mit jeweils eigener durch *in vitro*-Transkription hergestellter HCV-RNA.

Aus diesen Gründen konnten folglich nur die Zellviabilität und die Kotransfektion eines zweiten Reporters zu Aussagen über die Vergleichbarkeit der Transfektionsergebnisse herangezogen werden.

Die meisten Transfektionsergebnisse dieser Arbeit sind auf das Zellproliferationsreagenz WST-1 normalisiert, um Schwankungen der Zellviabilität innerhalb der Wells zu berücksichtigen. Diese Normalisierung gleicht folglich

unterschiedliche Zellzahlen aus, ungeachtet der Tatsache, dass die Ergebnisse durch eine unterschiedliche Transfektionseffizienz ebenfalls beeinflusst werden können. Um letzterer Tatsache gerecht zu werden, wurde in einem Folgeexperiment eine Reporter-RNA kodierend für die *Renilla*-Luziferase kotransfiziert. Diese wird intrazellulär cap-abhängig translatiert, folgt also einem anderen Translationsmechanismus als die IRES-vermittelte Translation der *Firefly*-Luziferase. Durch die Kotransfektion können also gleich zwei Variablen überprüft werden, durch die die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Einerseits wird die Effizienz der Lipofektion *per se* überprüft, indem man indirekt von der translatierten und damit erfolgreich transfizierten Koreporter-Menge auf die Menge an transfizierter HCV-Reporter-RNA schließen kann. Andererseits lassen sich durch die Normalisierung auf den Koreporter Unterschiede im Bereich der *in vivo*-Translationseffizienz aufdecken und korrigieren. Somit stellt die Kotransfektion neben dem WST-1-Assay eine weitere geeignete Methode dar, die Authentizität der gewonnenen Daten der Translation zu verifizieren und mögliche Transfektionsprobleme ausschließen zu können. Dabei muss angemerkt werden, dass eine quantitative Unterscheidung beider eben genannter Vorgänge allein mit dem RNA-Stabilitäts-Assay nicht möglich ist. Diesen Überlegungen zu Folge müssten die Translationseffizienzen der Experimente im Vergleich (normalisiert auf WST-1 sowie auf den Koreporter *Renilla*-Luziferase) ein ähnliches Bild ergeben. Tatsächlich zeigt sich in beiden Experimenten (vgl. Abbildung 2.1.3 und 2.1.4) ein ähnliches Ergebnis. Beide Abbildungen veranschaulichen den Rückgang der Stimulierung der Translation durch miR-122 mit zunehmender Anzahl der Nukleotid-Insertionen. Lediglich die Insertion von 10 Nukleotiden weist, normalisiert auf die Expression der *Renilla*-Luziferase, noch keinen signifikanten Unterschied auf im Vergleich zum HCV-Wildtyp, wohingegen das Konstrukt, normalisiert auf WST-1, bei dieser Insertionslänge schon einen signifikanten Unterschied aufweist. Beiden gemeinsam ist aber die Tatsache, dass die Stimulierbarkeit der Translation durch miR-122 bei einer Insertion von 20 Nukleotiden fast vollständig aufgehoben ist. Dadurch wird deutlich, dass zumindest für diese Versuchreihe sowohl die Normalisierung auf WST-1 als auch auf den *Renilla*-Koreporter identische Ergebnisse liefern und der Forderung von Barreau *et al.* (2006), Lipofektionsergebnisse durch hinreichende Kontrollexperimente zu untermauern, Rechnung getragen wird, die Ergebnisse folglich als authentisch anzusehen sind.

2.2.2 Einfluss des Angeborenen Immunsystems auf die Transfektion

Nachdem im vorangegangenen Teil eher methodische Störvariablen auf die Transfektion und deren Maßnahmen zur Verhinderung geschildert wurden, blieb noch die Frage offen, welchen Einfluss das Angeborene Immunsystem auf die Transfektion und deren Ergebnisse ausübt, da bereits Einflüsse beschrieben wurden (Tarr et al., 2012).

Bekannt ist, dass die Erkennung von viraler RNA durch zelluläre Toll-like-Rezeptoren (Takeda *et al.*, 2005) in einer gesteigerten Expression von Interferonen resultiert (Meylan *et al.*, 2006b; Lau *et al.*, 2008). Die TLR-7/8-abhängige Cytokin-Produktion zum Beispiel wird getriggert durch Uridin, Bestandteil von RNA (Sioud, 2006). Entsprechend bewirkt ein Austausch von Uridin durch Adenosin eine Aufhebung der Immunreaktion (Sioud, 2010), was anzeigt, dass Uridin wesentlich an der spezifischen Erkennung durch TLR7/8 beteiligt ist (Diebold et al., 2006). Prinzipiell wäre es also möglich, dass die Expression transfizierter HCV-Reporter-RNA in HuH-7-Zellen durch die Aktivierung des Angeborenen Immunsystems gestört wird und die HCV-Reporter-

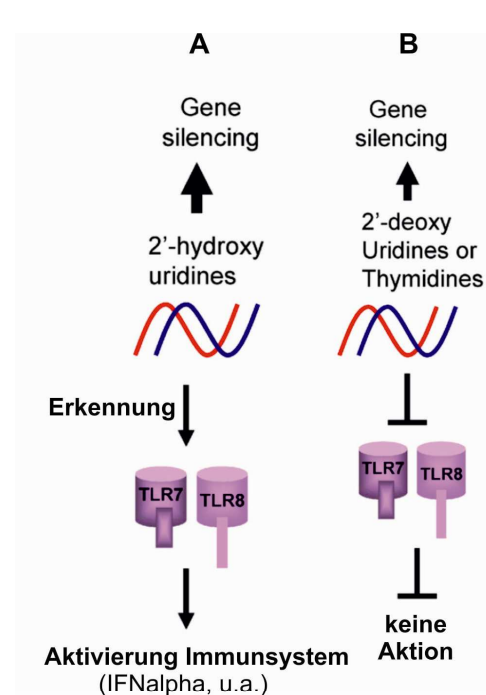


Abb. 2.2.3 Das Ersetzen von 2'-Hydroxy-Uridin mit 2'-desoxy-Thyminid innerhalb der RNA-Sequenz verhindert die Aktivierung des Angeborene Immunsystems. Während RNA, die 2'-hydroxy-Uridin enthält, an TLR7/8 bindet und durch ausgelöste Signalwege die Bildung von Interferonen provoziert (A), kann RNA mit 2'-desoxy-Thyminid nicht an TLR7/8 binden, wodurch die Aktivierung des Angeborenen Immunsystems über diesen Signalweg verhindert (B). *Modifiziert nach Sioud, 2010.*

RNA einem vorzeitigen zellulären Abwehrmechanismus unterliegt, was ebenfalls Einfluss nehmen könnte auf die Translation und damit auf die gewonnenen Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Experiment (siehe Abb. 2.1.6) statt der normal verwendeten miR-122 mit Uridin-Nukleosiden miR-122 mit desoxy-Thyminid verwendet. Dies sollte gewährleisten, dass das Angeborene Immunsystem zumindest nicht durch den in der Abbildung 2.2.3 aufgezeigten Signalweg aktiviert wird.

Vergleicht man nun die Stimulierung der Translation des HCV-Wildtyps durch miR-122 mit der der (dT)-miR-122 in HuH-7-Zellen, so lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Bezogen auf die Insertions-Mutanten

ergibt sich unter Verwendung von (dT)-miR-122 ein etwas anderes Ergebnis im Vergleich zur modifizierten miR-122. Das Konstrukt mit einer Insertion von 10 Nukleotiden zeigt noch keinen signifikanten Unterschied der Translationseffizienz im Vergleich zum HCV-Wildtyp unter Verwendung von (dT)-miR-122, wohingegen die Translationseffizienz desselben Konstrukts unter Verwendung von miR-122 schon einen signifikanten Rückgang im Vergleich zum HCV-Wildtyp aufweist. Beiden gleich ist die Tatsache, dass bei einer Insertion von 20 Nukleotiden die Stimulierbarkeit der Translation durch miR-122 nicht mehr nachzuweisen ist.

Eine weitere Möglichkeit, den oben angeführten Signalweg des Angeborenen Immunsystems zu umgehen, um die Transfektion vor dessen Einfluss zu bewahren, ist die Transfektion in HuH-7.5-Zellen (siehe Abb. 2.1.5). HuH-7.5-Zelllinien sind abgeleitet worden von HuH-7-Zellen (Randall et al., 2003) und weisen eine höhere Replikationsrate des HCV-Genoms auf (Blight et al., 2002). Dabei kodieren sie für eine funktionslose RIG-I-Helikase, die normalerweise durch Bindung der HCV-RNA die Expression von Interferonen zur Aktivierung des Immunsystems steigert (Saito et al., 2008; Sumpter et al., 2005). Aber auch mit diesen HuH-7.5-Zellen ließ sich kein wesentlicher Unterschied zu den Ergebnissen in HuH-7-Zellen aufzeigen.

Untersuchungen zeigen zudem, dass die miR-122 möglicherweise selbst indirekt die Erkennung der HCV-RNA durch die RIG-I-Helikase verhindert. In Machlin *et al.* (2011) ist zu sehen, dass die miR-122 bei Bindung an die erste Bindestelle innerhalb der HCV-5'-UTR einen 3'-Überhang bildet, der möglicherweise das 5'-Ende der HCV-RNA „maskiert“. Dadurch, dass die RIG-I-Helikase durch 3'-Überhänge inhibiert wird (Marques *et al.*, 2006; Schlee *et al.*, 2009), wird die HCV-RNA durch Bindung der miR-122 an die erste Bindestelle der HCV-5'-UTR möglicherweise vor der Erkennung durch das Immunsystem geschützt.

In beiden eben aufgeführten Experimenten, die den Auslösemechanismus des Angeborenen Immunsystems umgehen sollten, wurden die Transfektionen nach demselben Protokoll durchgeführt wie für HuH-7-Transfektionen, was eine bessere Vergleichbarkeit untereinander sicherstellen sollte.

Ergänzend zu oben genannten Mechanismen, die die Transfektion stören könnten, besteht noch die Möglichkeit, dass transfizierte HCV-Reporter-RNA im Rahmen des intrazellulären Immunprozesses durch vom Angeborenen Immunsystem induzierte Autophagosomen (Oh *et al.*, 2012) abgebaut werden kann. In der Literatur beschrieben ist die Induktion der Autophagozytose durch kationische Lipide, wie sie im Lipofectamine® 2000 zur Transfektion enthalten sind (Man *et al.*, 2010), oder durch Komplexe aus Lipofectamine® 2000 und kleiner interferierender RNA (engl. *small interfering RNA*, siRNA), die während der Transfektion gebildet werden (Mo *et al.*,

2012). Möglich ist auch die Induktion von Autophagosomen durch aktivierte Toll-like-Rezeptoren (Lee *et al.*, 2007). Die Daten aus oben genannten Veröffentlichungen beweisen zwar einen Anstieg der Menge an Autophagosomen durch Transfektion und damit einen möglichen Einfluss auf die Transfektionsergebnisse, die Aussagen hierüber beruhen jedoch stets auf Zeitpunkten ab mindestens 5 Stunden nach Transfektion, spielen für die Transfektionen dieser Arbeit mit einer Gesamtdauer von 4 Stunden also eine eher untergeordnete Rolle.

Alle diese Überlegungen legen nahe, dass das Angeborene Immunsystem bei Transfektionen nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Protokoll in HuH-7-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die Translationsergebnisse hat.

2.2.3 Vorhergesagte Sekundärstrukturen der verwendeten HCV-Konstrukte

In dieser Arbeit ist der Einfluss der miR-122 auf verschiedene HCV-Reporterkonstrukte untersucht worden, die im Vergleich zur HCV-Wildtyp-RNA Nukleotid-Insertionen der Längen 5, 10 und 20 zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-5'-UTR aufweisen (siehe Abbildung 2.1.3 A). Da die Nukleotid-Abfolge innerhalb der miR-122-Bindestellen der HCV-RNA unter allen HCV-Subtypen hochkonserviert ist, wurde daher untersucht, inwieweit sich der Einfluss der miR-122 auf die HCV-

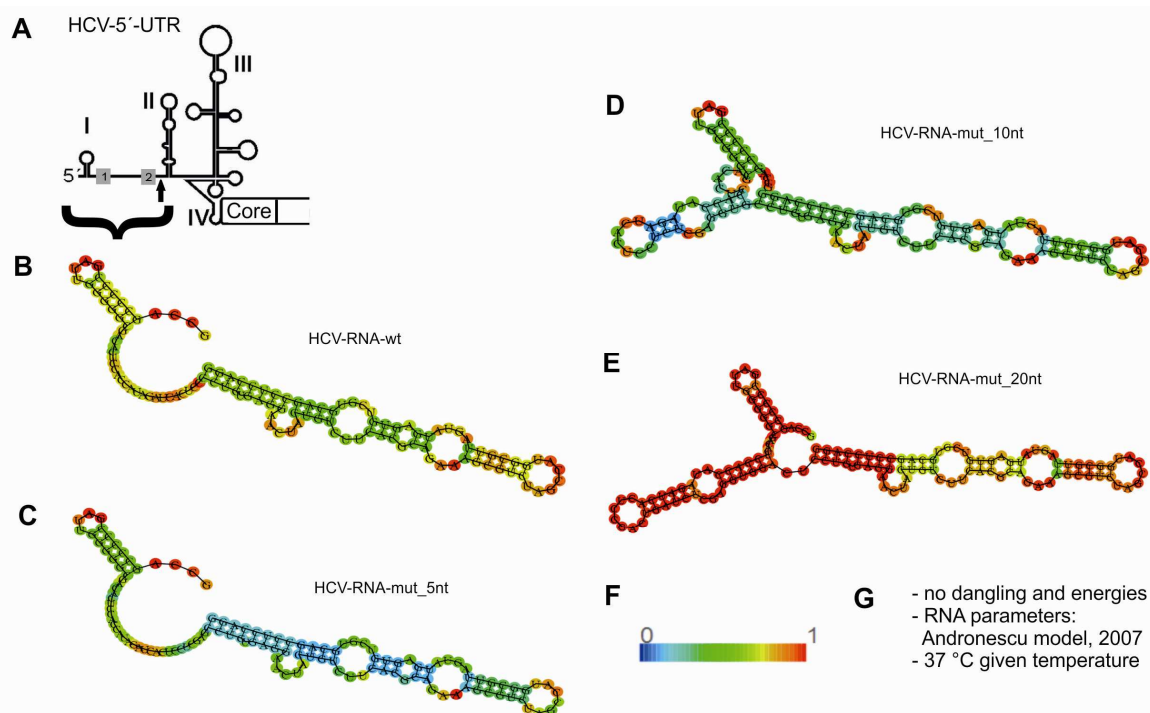


Abb. 2.2.4 Wahrscheinliche Sekundärstrukturen der verwendeten HCV-Konstrukte

(A) Analytierte Region der Sekundärstruktur der 5'-UTR der HCV-RNA (Klammer) und Lokalisation der eingefügten Nukleotide (Pfeil). (B, C, D, E) Wahrscheinliche Sekundärstrukturen und Basenpaarungen der verwendeten HCV-Konstrukte (Quelle: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). (F) Farbkodierung der Wahrscheinlichkeit der gebildeten Basenpaarungen. (G) Parametereinstellung.

Translation mit zunehmender Länge verändert. Durch die Nukleotid-Insertionen wird die Stimulierung der Translation durch miR-122 signifikant reduziert und ist bei einer Insertion von 20 Nukleotiden nicht mehr nachweisbar.

Dies kann zum einen darin begründet sein, dass an der Initiation der Translation beteiligte Proteine auf Grund der geänderten Konfiguration nicht mehr korrekt „binden“ können, andererseits sollte aber ein funktioneller Einfluss untersucht werden, da durch die Insertionen veränderte Sekundärstrukturen möglich sind, die wiederum ihrerseits die Translation stören könnten.

Abbildung 2.2.4 zeigt die wahrscheinlichen Sekundärstrukturen der verwendeten HCV-Reporterkonstrukte. Dabei wird deutlich, dass Nukleotid-Insertionen der Länge 10 und 20 innerhalb dieses Bereichs neue Basenpaarungen eingehen, was in einer zusätzlichen Schleife resultiert, während die 5-Nukleotid-Insertion keine neuen Basenpaarungen im Vergleich zum HCV-Wildtyp eingeht. Die neu entstandenen Basenpaarungen der HCV-Reporter-RNA mit der 10-Nukleotid-Insertion betreffen jedoch nicht die miR-122-Bindestellen, womit die neu eingegangenen Basenpaarungen relativ vernachlässigt werden können. Wichtig ist jedoch, dass die Basen der miR-122-Bindestelle des Konstrukts mit der 20-Nukleotid-Insertion Paarungen eingehen und somit nicht mehr für die Bindung der miR-122 zur Verfügung stehen. Bei der Interpretation der Translationsergebnisse des Konstrukts mit der 20-Nukleotid-Insertion sollte diese Tatsache daher berücksichtigt werden, da es möglich ist, dass die nicht mehr nachweisbare Stimulierung der Translation durch miR-122 allein durch die möglichen Basenpaarungen bedingt sein kann.

2.3 Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe

Im vorigen Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit zunehmendem Abstand der miR-122-Bindestelle zum Stem-Loop II der 5'-UTR der HCV-Reporter-RNA der nachgewiesene stimulierende Effekt der microRNA-122 auf die Translation reduziert wird und bei einer Insertion von 20 Nukleotiden keine Stimulierung der Translation mehr nachzuweisen ist.

In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass durch die miR-122 die Bildung der 48S-Translations-Initiationskomplexe im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (engl. *rabbit-reticulocyte-lysate*, RRL) stimuliert wird (Henke und Goergen *et al.*, 2008). Die Ergebnisse basieren jedoch lediglich auf dem *in vitro*-System RRL und beruhen daher auf einem Mechanismus der Translationsstimulierung, der sich von dem in Zellen deutlich unterscheidet (Goergen *et al.*, 2012).

In diesem Teil der Arbeit soll daher untersucht werden, ob sich der stimulierende Effekt der miR-122 auch in HuH-7-Zellen auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe niederschlägt beziehungsweise welchen Einfluss die Insertionsmutanten auf die Bildung dieser Komplexe in diesen Zellen ausübt.

2.3.1 Prinzip der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Zur Analyse der Translations-Initiationskomplexe wurde die Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation herangezogen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschreiben diese Methode für das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, ein *in vitro*-System (Anthony und Merrick *et al.*, 1992; Niepmann *et al.*, 1997). Diese Methode wurde in dieser Arbeit für *in vivo*-Systeme, speziell HuH-7-Zellen, optimiert und getestet.

Dabei wird ³²P-radioaktiv markierte HCV-Reporter-RNA (s. Abb. 2.3.1 I) in HuH-7-Zellen transfiziert. 4 Stunden nach Transfektion werden die Zellen lysiert und das Lysat nach Entfernen der Kerne durch Zentrifugation auf einen vorher hergestellten Sucrose-Dichtegradienten (Herstellung siehe Kapitel 4.2.5.2) aufgetragen. Der Sucrose-Dichtegradient (s. Abb. 2.3.1 II) wurde jeweils am Vortag mit 10-50 %-igen Sucroslösungen hergestellt, über Nacht bei -20 °C tiefgefroren und am Versuchstag aufgetaut, sodass sich die einzelnen Phasen durch das Auftauen vorsichtig vermischt haben und ein annähernd kontinuierliches Dichtegefälle entstehen konnte. Nach Beladung des Gradienten mit dem Lysat wurde der Gradient bei 4 °C und mit 40.000

Umdrehungen pro Minute (engl. *rounds per minute*, rpm) ultrazentrifugiert, damit die gebildeten Translationskomplexe entsprechend ihrer Größe entlang des Dichtegefälles wandern konnten. Der Lauf wurde nach 3 Stunden abgebrochen und der Sucrose-Dichtegradient in Fraktionen von je 400 µl fraktioniert (s. Abb. 2.3.1 III), mit RotiSint® eco plus der Firma Roth zur Signalverstärkung versetzt und die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Scintillator in Zerfällen pro Minute (engl. *counts per minute*, cpm) gemessen, um die Positionen der ribosomalen Translations-Initiationskomplexe zu ermitteln.

Die relative Radioaktivität (% cpm) wurde anschließend entsprechend der Fraktionen abgebildet, was ein Abbild der Verteilung der HCV-Reporter-RNA in Gradienten lieferte (s. Abb. 2.3.1 IV).

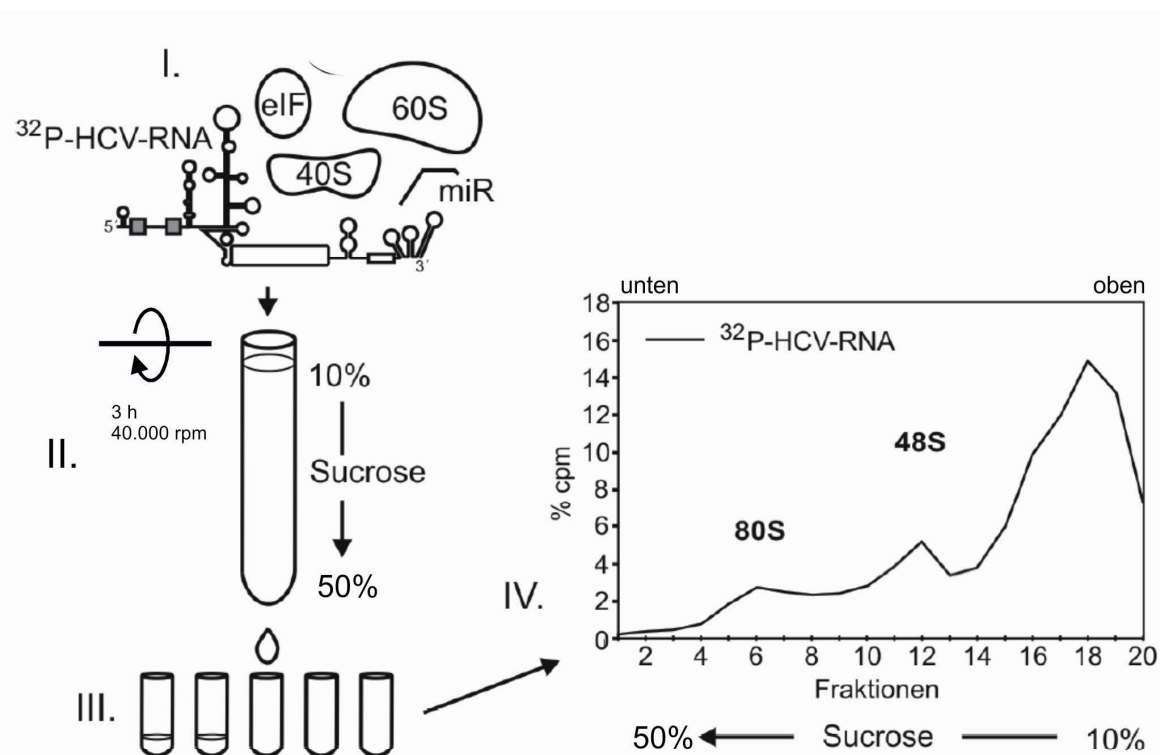


Abb. 2.3.1 Prinzip der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und Analyse

(I) Das Zell-Lysat von transfizierten (mit radioaktiv markierter HCV-Reporter-RNA) HuH-7-Zellen wird auf einen 10 - 50 %-igen Sucrose-Dichtegradienten aufgetragen und (II) für 3 Stunden bei 40.000 rpm ultrazentrifugiert. (III) Nach Ultrazentrifugation wird der Gradient in je 400 µl fraktioniert und (IV) die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Scintillator in cpm (engl. *counts per minute*) gemessen.

2.3.2 Optimierung der Methode für HuH-7-Zellen

Da die Methode der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bisher nur für Kaninchen-Retikulozyten-Lysat beschrieben wurde, musste die Methode für die Analyse der Translations-Initiationskomplexe zuerst für HuH-7-Zellen optimiert werden. Dazu wurden zuerst leicht modifizierte Parameter wie Laufzeit der Ultrazentrifugation oder Fraktionsgröße wie in Niepmann *et al.* (1997) beschrieben angewendet. Radioaktiv markierte HCV-Reporter-RNA wurde in HuH-7-Zellen transfiziert, das Lysat auf den Sucrose-Gradienten aufgetragen, bei 40.000 rpm für 5,5 Stunden ultrazentrifugiert und anschließend in Fraktionen von je 500 µl zur Detektion der Radioaktivität fraktioniert.

Zur Analyse wurde auf Grundlage der relativen Menge an Radioaktivität nach Fraktionierung ein Gradientenprofil erstellt (s. Abb. 2.3.2 A). Dargestellt sind die Fraktionen 1 – 23 mit je 500 µl Größe bei einer Prozentigkeit der Sucrose von 10 bis 35. Aufgetragen ist jeweils zum Vergleich die HCV-Wildtyp-RNA entweder mit miR-122 oder miR-124. In beiden Fällen beträgt die kumulative relative Radioaktivität der ersten zehn Fraktionen mehr als 5 % der Gesamtaktivität. Zudem wird deutlich, dass in Fraktion 1 (entspricht der Prozentigkeit von 35 beziehungsweise dem Boden des Sucrose-Röhrchens) noch ein relativ hoher Anteil an Radioaktivität messbar wird, was anzeigt, dass sich dort offensichtlich mehrere Polysomen-Komplexe akkumuliert haben, weil die Ultrazentrifugation mit einer Gesamtdauer von 5,5 Stunden zu lange angesetzt war.

Hinzu kommt, dass zwischen den Fraktionen teilweise große „Aktivitätssprünge“ vorkommen, was zu Lasten der Auflösung geht und an der Fraktionsgröße beziehungsweise der zu niedrig gewählten Prozentigkeitsspanne liegen könnte.

Für die folgenden Versuche mit Sucrose-Dichtegradienten wurden daher Gradienten mit einem Prozentigkeitsgefälle von 10 bis 50 % hergestellt und die Fraktionsgrößen von 500 µl auf 400 µl verkleinert, was die Anzahl der Fraktionen insgesamt vergrößerte. Um zu verhindern, dass sich unter Umständen Polysomen auf Grund hoher Laufzeiten der Ultrazentrifugation am Boden sammeln und das Gesamtbild des Gradientenprofils verzerren, wurde die Laufzeit von 5,5 Stunden auf 3 Stunden reduziert.

Abbildung 2.3.2 B zeigt ein Gradientenprofil nach Ultrazentrifugation, welche nach den genannten Änderungen durchgeführt wurde. Die kumulative relative Radioaktivität konnte durch Reduzierung der Laufzeit auf 3 Stunden in den ersten zehn Fraktionen deutlich reduziert werden. Die erste Fraktion weist zudem keine Radioaktivität mehr auf, was andeutet, dass wohl keine Polysomen mehr „verpasst“ worden sind. Zur

späteren Identifizierung von Translations-Initiationskomplexen und/oder Polysomen eignet sich die nun eingestellte Auflösung, die aus der verringerten Fraktionsgröße und dem erhöhten Prozentigkeitsgefälle resultiert, deutlich besser als die Fraktionierung mit den vorher verwendeten Parametern.

Zusätzlich wurden sämtliche folgenden Versuche von Ende der Transfektion an bis zur Fraktionierung im Kühlraum bei 6 °C durchgeführt, um eine frühzeitige Dissoziation der Translationskomplexe zu verhindern.

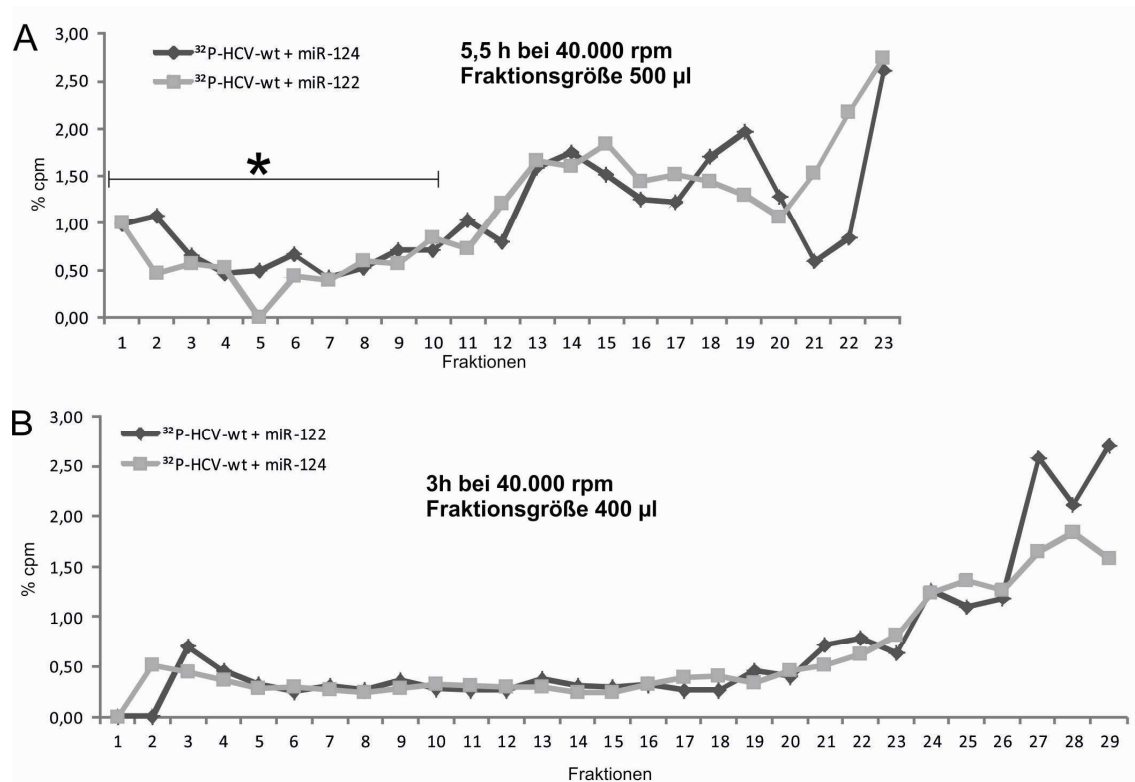


Abb. 2.3.2 Die Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation über 3,0 Stunden bei 40.000 rpm und die Fraktionierung in 400 µl ergeben eine bessere Auflösung der Gradientenprofile, die für die Analyse der Translations-Initiationskomplexe benötigt wird. (A) Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation über 5,5 Stunden bei 40.000 rpm und Fraktionsgröße von 500 µl. Markiert (*) sind die Fraktionen 1-10, deren relative kumulative Radioaktivität (% cpm) für ^{32}P -HCV-wt + miR-124 6,73 % und für ^{32}P -HCV-wt + miR-122 5,4 % betragen. **(B)** Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation über 3,0 Stunden bei 40.000 rpm und Fraktionsgröße von 400 µl.

Zur Lyse der transfizierten Zellen wurde im ersten Teil dieser Arbeit sowie beim ersten Versuch dieses Teils (s. Abb. 2.3.2 A) der passive Lyse-Puffer der Firma Promega verwendet. Die lässt jedoch die Tatsache außer Acht, dass assoziierte Ribosomen während und nach Lyse dissoziieren können, was die Ergebnisse im Gradientenprofil verzerren könnte. Daher wurde für folgende Versuche ein selbst hergestellter Puffer verwendet, dessen Gehalt an Magnesium zehnfach (30 mM) so hoch ist wie der physiologische (3 mM), da hohe Magnesiumkonzentrationen die ribosomale

Assoziation stabilisieren (Goss *et al.*, 1986) und somit ein besseres Abbild der ribosomalen Assoziation und damit der Translationskomplexe gewährleistet ist.

2.3.3 Identifizierung der 48S-/80S-HCV-Translations-Initiationskomplexe

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den Einfluss von miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe zu untersuchen. Dabei könnte die miR-122 sowohl Einfluss auf die Bildung des 48S-Komplexes als auch auf die des 80S-Komplexes nehmen. Um die Komplexe in nachfolgenden, standardisierten Versuchen eindeutig zu einzelnen Fraktionen zuordnen zu können, mussten zuerst die Fraktionen identifiziert

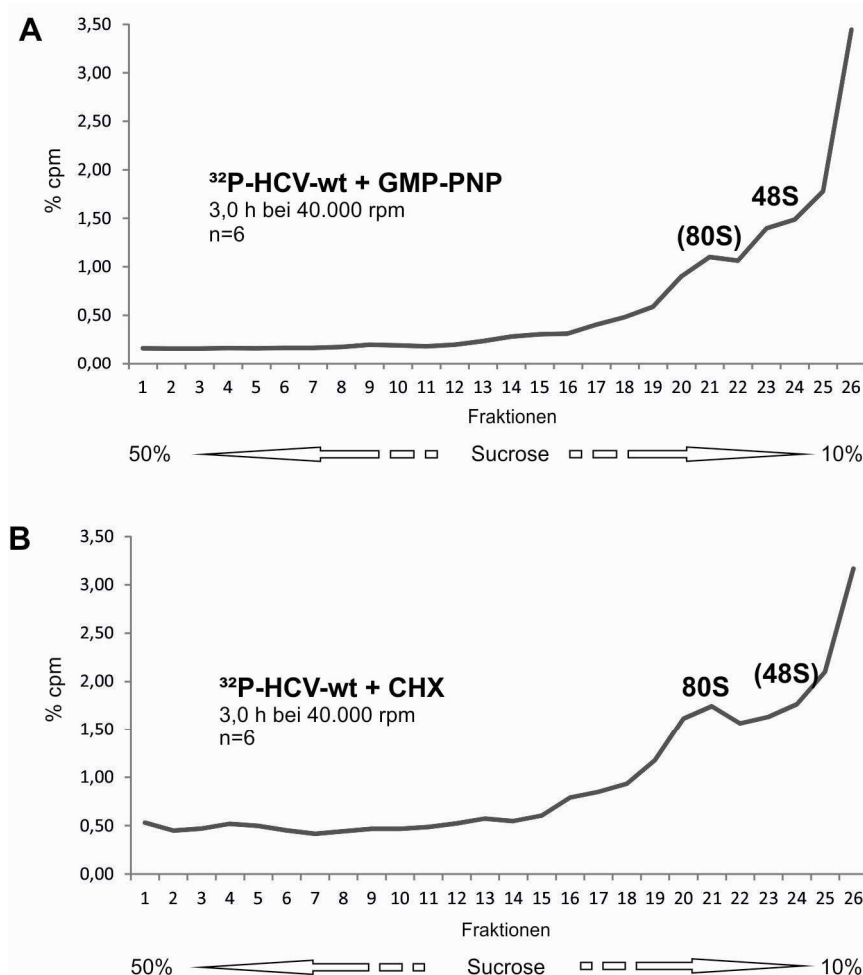


Abb. 2.3.3 Identifizierung der 48S-/80S-HCV-Translations-Initiationskomplexe.

Nach Transfektion der radioaktiv markierten HCV-RNA (^{32}P -HCV-wt) in HuH-7-Zellen und anschließender Ultrazentrifugation aufgetrennte Sucrose-Dichtegradienten-Fractionen 1 - 26, gemessen wurde jeweils die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in cpm **(A)** Gradientenprofil nach Ultrazentrifugation mit Zugabe von je 2 mM GMP-PNP direkt zum Transfektionsansatz zur Identifizierung des 48S-Initiationskomplexes (Fraktion 23 - 24) **(B)** Gradientenprofil nach Ultrazentrifugation mit Zugabe von 2 mM Cycloheximid (CHX) 30 min vor Ende der Transfektion zur Identifizierung der 80S-Initiationskomplexe (Fraktionen 20 - 22).

werden, in denen 48S- und 80S-Komplexe in Folgeversuchen erwartet werden können. Zur Identifizierung von 48S-Initiationskomplexen wurden 20 µl (2 mM pro Well) des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons 5'-Guanylyl-Imidodiphosphat (GMP-PNP) direkt zum Transfektionsansatz in HuH-7-Zellen zugegeben. GMP-PNP hemmt die Initiation der Translation auf Stufe des 48S-Komplexes (Locker *et al.*, 2006), indem es die Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTPs hemmt, und führt so zu einer Akkumulierung von 48S-Komplexen, was sich in einer erhöhten relativen Radioaktivität im Gradientenprofil niederschlägt. Der 48S-Translationskomplex ist in Fraktion 23/24 (s. Abb. 2.3.3 A) im Vergleich mit der CHX-Kontrolle erkennbar und lässt sich somit in Folgeversuchen im Bereich dieser Fraktionen identifizieren.

Durch Zugabe von 5 µl (2 mM pro Well) Cycloheximid (CHX) 30 min vor Transfektionsende wurde die Elongation der Translation gehemmt (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010), was zur Akkumulierung von 80S-Komplexen führt. Die überdurchschnittlich erhöht gemessene relative Radioaktivität in Fraktion 20, 21 und 22 (s. Abb. 2.3.3 B) identifiziert den Bereich, in dem 80S-Translationskomplexe in Folgeversuchen zu erwarten sind.

2.3.4 Analyse der Sucrose-Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe ausübt, wurde radioaktiv markierte HCV-Wildtyp-RNA (s. Abb. 2.3.4 A) in HuH-7-Zellen transfiziert, entweder in Anwesenheit der die Translation stimulierenden miR-122 oder der miR-124 als Negativkontrolle. Parallel wurde die HCV-RNA mit der Insertion von 20 Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der 5'-UTR (s. Abb. 2.3.4 B) in HuH-7-Zellen transfiziert, wieder entweder mit miR-122 oder miR-124. Die Translationseffizienz der Insertionsmutante mit 20 Nukleotiden zeigte im ersten Teil dieser Arbeit in der Effizienz der Stimulierung der Translation durch miR-122 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur HCV-Wildtyp-RNA. Der stimulierende Effekt der miR-122 auf die Translation ist in sämtlichen Versuchen mit dieser HCV-Insertionsmutante ausgeblieben. Die Insertionsmutante kann daher für den Direktvergleich zur HCV-Wildtyp-RNA herangezogen werden und abbilden, in wieweit sich der ausbleibende stimulierende Effekt auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe niederschlägt. Man kann davon ausgehen, dass sich während der Inkubationszeit der Transkription der HCV-Reporter-RNA in HuH-7-Zellen

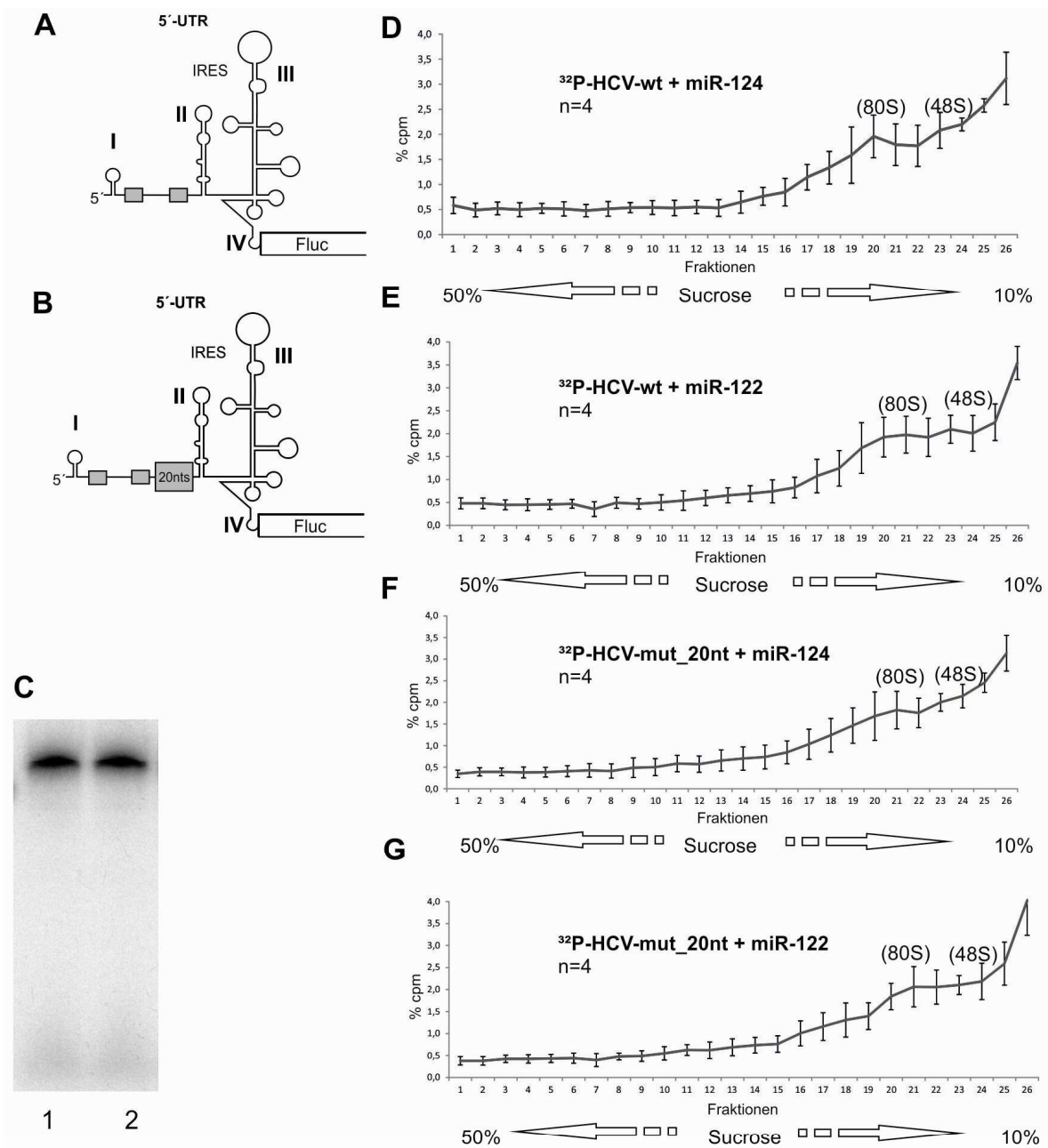


Abb. 2.3.4 Analyse der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation. Transfiziert wurde radioaktiv markierte HCV-Wildtyp-Reporter-RNA (**A**, ^{32}P -HCV-wt) in HuH-7-Zellen oder das durch 20 Nukleotide zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-IRES verlängerte, radioaktiv markierte HCV-Konstrukt (**B**, ^{32}P -HCV-mut_20nt), entweder mit Zugabe von miR-122 oder miR-124. (**C**) Beispiel eines Polyacrylamid-Gels nach *in-vitro*-Transkription von ^{32}P -HCV-wt (1) und ^{32}P -HCV-mut_20nt (2). (**D**, **E**, **F**, **G**) Erstellung eines Gradientenprofils nach Ultrazentrifugation.

ein Gleichgewicht an assoziierenden und dissoziierenden Transkriptionsfaktoren einstellt (sog. Steady-State-Level). Aussagen über die Bildung der Translations-Initiationskomplexe beziehen sich daher im Folgenden stets auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe.

Für sämtliche Versuche wurde jeweils neue HCV-RNA durch *in vitro*-Transkription hergestellt und zur Kontrolle auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (s. Abb. 2.3.4 C). Nach Transfektion und Lyse wurde das Lysat auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen, bei 40.000 rpm ultrazentrifugiert, in je 400 µl fraktioniert und die relative Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Scintillator gemessen. Abbildungen 2.3.4 D, E, F sowie G zeigen die Gradientenprofile nach Ultrazentrifugation der jeweiligen HCV-Reporter-RNA und microRNA. Sämtliche Versuche wurden jeweils viermal durchgeführt, um ein statistisch verwertbares Ergebnis zu erhalten.

Gekennzeichnet in den Gradientenprofilen sind jeweils die Fraktionen, in welchen man 48S- bzw. 80S-Translationskomplexe identifizieren kann. Nachfolgend werden die in Abbildung 2.3.4 gezeigten Daten durch direkte Vergleiche jeweils zweier Gradientenprofile ausgewertet. Die Balken für die Standardabweichung sind dabei der Übersichtlichkeit wegen weggelassen.

2.3.5 miR-122 hat keinen Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe

Um den Einfluss der miR-122 auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe zu untersuchen, wurde in Abbildung 2.3.5 A das Gradientenprofil der HCV-Wildtyp-RNA mit miR-122 mit dem der HCV-Wildtyp-RNA mit miR-124 verglichen. miR-124 hat keinen Einfluss auf die HCV-Translation, wurde aber mit transfiziert, um äquivalente Mengen an gesamt transfizierter RNA zu gewährleisten. Die Fraktionen, in denen 48S- bzw. 80S-Translations-Initiationskomplexe erwartet werden können, sind entsprechend überschrieben worden. Zur besseren Vergleichbarkeit sind in Abbildung 2.3.5 lediglich die Fraktionen 13-26 der Gradientenprofile abgebildet, das gesamte Gradientenprofil mit allen Fraktionen ist in Abbildung 2.3.4 gezeigt.

In den entsprechend markierten Fraktionen, die mit 48S und 80S überschrieben sind, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Transfektion mit oder ohne miR-122.

In Abbildung 2.3.5 B wurde das Gradientenprofil der um 20 Nukleotide verlängerten Insertionsmutante mit miR-122 oder miR-124 verglichen. Die Translation der

Insertionsmutante HCV-mut_20nt zeigte signifikant bei Transfektionsversuchen keine Stimulierbarkeit mehr durch miR-122. Dies lässt vermuten, dass ein Einfluss der miR-122 auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe mit dieser Methode nicht nachweisbar ist.

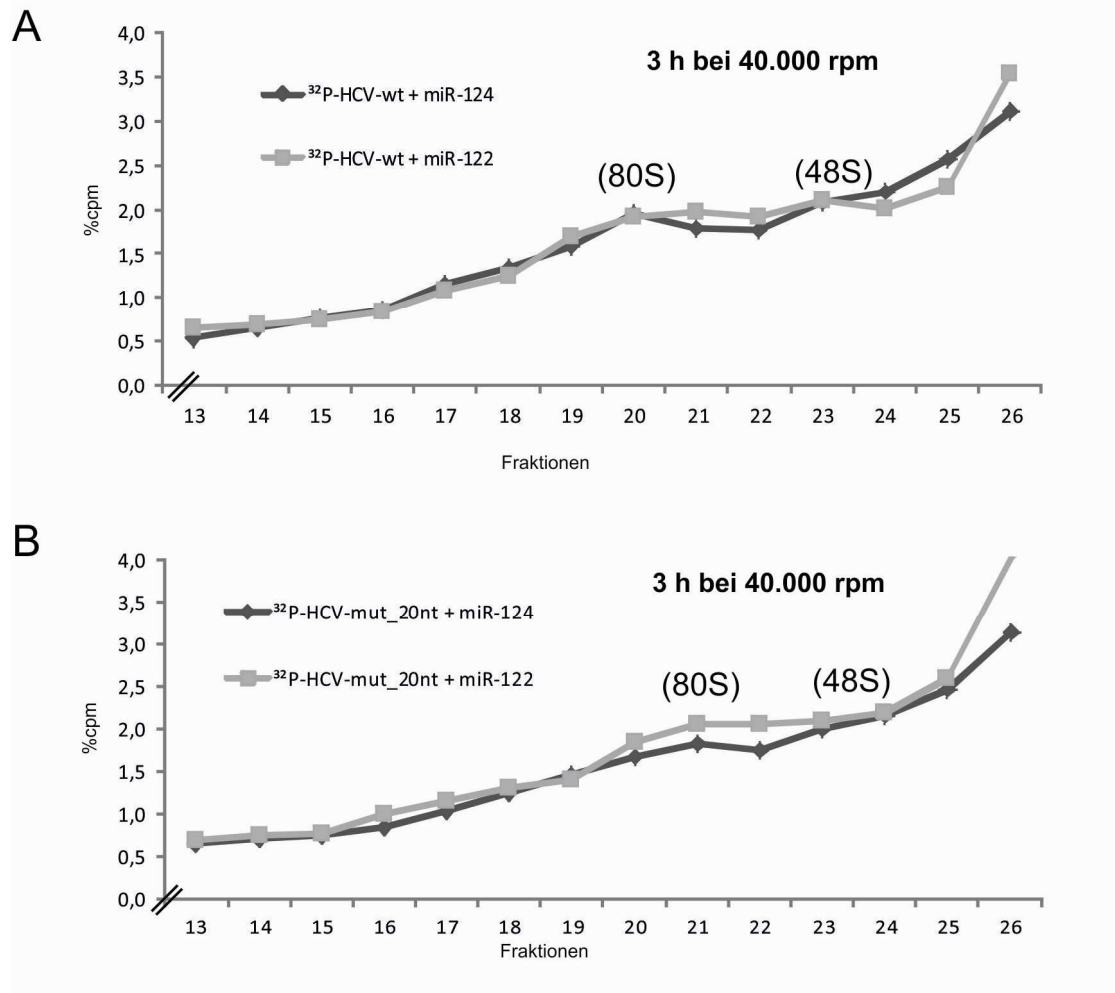


Abbildung 2.3.5 miR-122 hat keinen signifikanten Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe während der Transfektion in HuH-7-Zellen. Analyse der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen nach Fraktionierung und Messung der relativen Radioaktivität. **(A)** Vergleich der Fraktionen des HCV-Wildtyps [^{32}P -HCV-wt] + miR-124 oder miR-122 (Daten aus Abb. 2.10 B und D) sowie **(B)** des um 20 Nukleotide verlängerten HCV-Konstruktes [^{32}P -HCV-mut_20nt] + miR-124 oder miR-122 (Daten aus Abb. 2.10 E und H). Die Standardabweichungen sind der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigt.

2.3.6 Nukleotid-Insertionen in der HCV-5'-UTR zeigen keinen Effekt auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe

Der vorangehende Teil zeigt, dass die miR-122 keinen Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe hat. Da sich die Translationseffizienz der HCV-Wildtyp-RNA signifikant von der der HCV-mut_20nt unterscheidet (s. Abb. 2.1.3),

wurden in Abbildung 2.3.6 die Gradientenprofile der benannten Reporter-RNAs miteinander verglichen, einerseits mit Zugabe von jeweils miR-124 (Abb. 2.3.6 A) oder mit Zugabe von jeweils miR-122 (Abb. 2.3.6 B). Die Fraktionen, in denen Translations-Initiationskomplexe erwartet werden können, sind jeweils mit 48S beziehungsweise 80S überschrieben. Die Gradientenprofile bilden zur Verdeutlichung jeweils nur als Ausschnitt die Fraktionen 13 bis 26 ab.

Es zeigt sich bei beiden Gradientenprofil-Vergleichen kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Fraktionen. Die Beträge der Standardabweichungen (in Abbildung 2.3.6 nicht gezeigt, ersichtlich in Abbildung 2.3.4) übersteigen die Differenzen zwischen den jeweils gezeigten Ausschnitten deutlich. Daraus kann geschlossen werden, dass das Einfügen von 20 Nukleotiden zwischen die zweite miR-122-Bindestelle und dem Stem-loop II der HCV-5'-UTR keinen Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe hat.

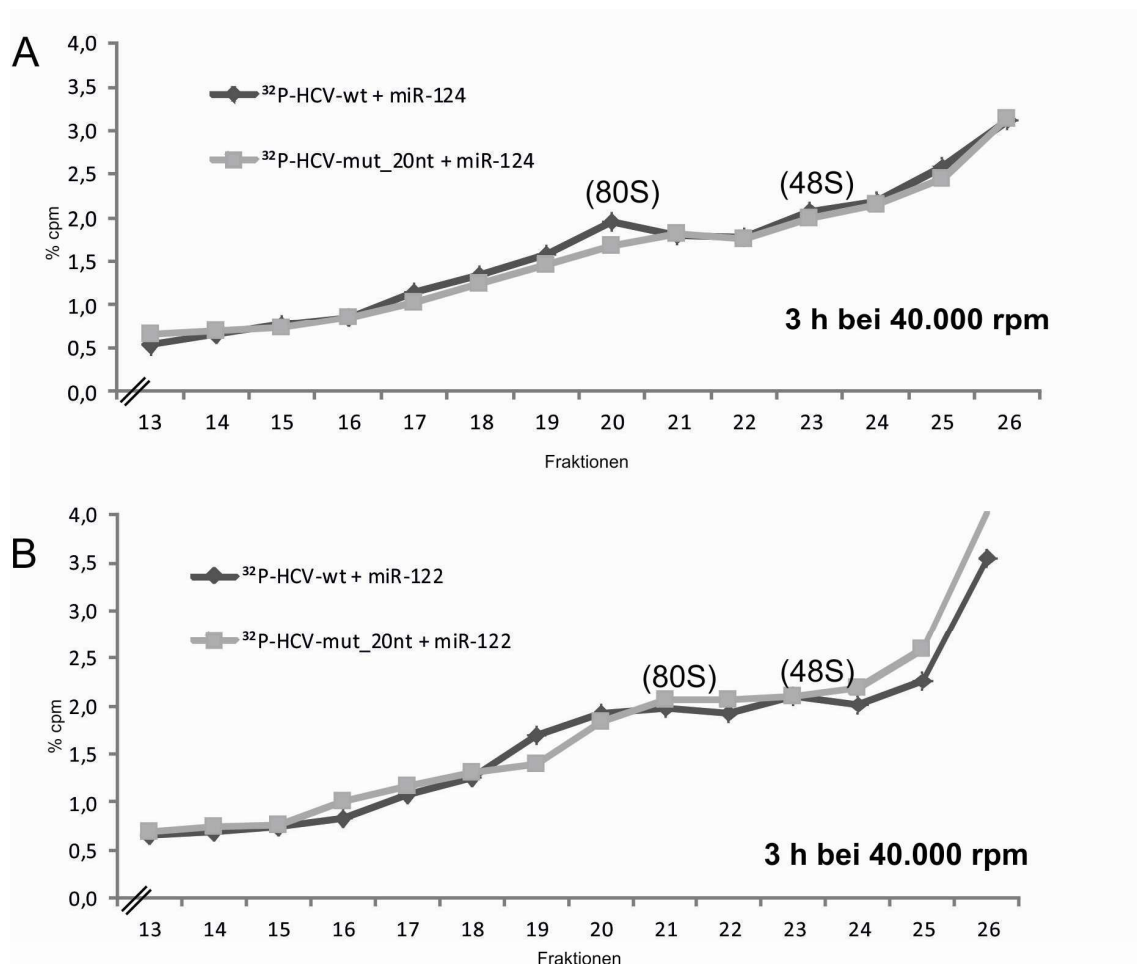


Abb. 2.3.6 Das Einfügen von 20 Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem Loop II der HCV-RNA hat keinen signifikanten Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe während der Transfektion in HuH-7-Zellen. Analyse der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen nach Fraktionierung und Messung der relativen Radioaktivität. Vergleich der Fraktionen der beiden Konstrukte ^{32}P -HCV-wt und ^{32}P -HCV-mut_20nt in Anwesenheit von (A) miR-124 (Daten aus Abb. 2.10 B und E) bzw. (B) miR-122 (Daten aus Abb. 2.10 D und H). Die Standardabweichungen sind der Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigt.

2.3.7 Fazit

Zur Durchführung der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach Transfektion in HuH-7-Zellen und Abbildung der Translations-Initiationskomplexe sind eine Laufdauer der Ultrazentrifugation von 3 Stunden und eine anschließende Fraktionierung in je 400 µl optimal. Im standardisiert abgebildeten Gradientenprofil zeigen sich 48S-Komplexe in etwa bei Fraktion 23/24, 80S-Komplexe werden bei Fraktion 20 bis 22 erkennbar. Die miR-122 hat weder Einfluss auf die Effizienz des Steady-State-Levels der 48S-Komplexbildung noch auf den der 80S-Komplexbildung. Die 20-Nukleotid-Insertionsmutante HCV-mut_20nt zeigte keinen signifikanten Unterschied des Steady-State-Levels im Vergleich zur HCV-Wildtyp-RNA.

2.4 Technische Diskussion Teil II

Diese Arbeit zeigt, dass die miR-122-vermittelte Stimulierung der Translation durch Nukleotid-Insertionen zwischen der zweiten miR-122-Bindestelle und dem Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert wird, ab einer Insertionslänge von 20 Nukleotiden sogar nicht mehr nachweisbar ist. In dem vorangehenden Teil dieser Arbeit wurde mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation versucht zu analysieren, wie sich die Nukleotid-Insertionen auf die Effizienz der Bildung der Translations-Initiationskomplexe *in vivo* auswirken.

Vergleicht man die durch Ultrazentrifugation erstellten Gradientenprofile für den Zeitpunkt 3 Stunden nach Transfektionsende der HCV-RNA mit und ohne miR-122 (siehe Abbildung 2.3.5), so lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Effizienz der Bildung der Translations-Initiationskomplexe nachweisen. Auch der Vergleich von HCV-Wildtyp-RNA mit dem um 20 Nukleotide verlängerten Konstrukt HCV-mut_20nt (beide unter Zugabe von miR-122) zeigt keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe (siehe Abbildung 2.3.6).

2.4.1 Optimierung der *in vivo*-Translationen

Zur Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen wurde die Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation benutzt, erstmals beschrieben von Anthony und Merrick (1992). Grundsätzlich wurde die Methode mit leicht modifizierten Parametern wie in Niepmann *et al.* (1997) angewandt. Bei der Durchführung in dieser Arbeit war jedoch zu beachten, dass sich diese Angaben auf die Durchführung im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat beziehen, folglich optimiert sind für ein *in vitro*-System, dessen Bedingungen sich zur Durchführung von Translationsexperimenten allein schon vom zeitlichen Aspekt her grundsätzlich von *in vivo*-Translationen wie in dieser Arbeit durchgeführt unterscheiden. Die Methode musste folglich für Translationen in HuH-7-Zellen optimiert werden. Im Kapitel 2.3.2 wird bereits auf die geänderten Parameter eingegangen, Abbildung 2.4.1 zeigt zusammenfassend sämtliche optimierten Parameter, wie sie in dieser Arbeit auf Grund der durchgeführten Optimierung Anwendung finden.

Nach Transfektion von HCV-Reporter-RNA in HuH-7-Zellen wurden diese nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden mit einem selbst hergestellten Lyse-Puffer lysiert. Dieser



Abb. 2.4.1 Optimierte Parameter der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für HuH-7-Zellen. Dargestellt sind die geänderten Parameter, wie sie in dieser Arbeit Anwendung zur Analyse der Translations-Initiationskomplexe für *in vivo*- Systeme finden. Grundsätzlich wurde die Methode wie in Niepmann *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt.

enthält die der physiologischen um 10-fach höhere Magnesium-Konzentration, was die Stabilität der ribosomalen Komplexe nach der Lyse der HuH-7-Zellen gewährleisten sollte, da hohe Magnesium-Konzentrationen zumindest die ribosomalen 80S-Komplexe stabilisieren (Goss *et al.*, 1986).

Erste Ultrazentrifugationen in HuH-7-Zellen nach der Methode, die für das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat beschrieben wurde, ergaben nicht die gewünschte Auflösung und legten die Vermutung nahe, dass die Dauer der Ultrazentrifugation mit 5,5 Stunden zu hoch angesetzt ist, da sich in der ersten Fraktion (entspricht im Ultrazentrifugationsröhrchen dem Boden beziehungsweise einer Prozentigkeit von annähernd 50 %) bereits im Scintillationsauszähler gemessene Radioaktivität akkumulierte. Die Möglichkeit, mit dieser Methode auch Polysomen zu identifizieren, wäre durch die beobachtete Akkumulierung womöglich verloren gegangen. Um dem gerecht zu werden, wurde die Ultrazentrifugation auf eine Dauer von 3 Stunden begrenzt. Daraus resultierte zwar eine geringere Auftrennung der Komponenten des Lysats nach ihrer Größe, die erste Fraktion zeigte in Versuchen mit der kürzeren Dauer aber keine Radioaktivität mehr, was sicherstellte, dass sich keine Polysomen am Boden des Röhrchens ansammelten, welche dann zur Analyse nicht mehr zur Verfügung gestanden hätten.

Mit der verkürzten Ultrazentrifugationsdauer geht jedoch auch automatische eine geringere Auftrennung nach Größe der mit Initiationskomplexen beladenen HCV-RNA einher. Um dennoch eine gute Auflösung zu erhalten, wurde die Fraktionsgröße von 500 µl auf 400 µl reduziert, die Anzahl der Fraktionen damit auf 26 erhöht. Zusätzlich dazu wurde das Prozentigkeitsgefälle um drei weitere Stufen erweitert. Die nun insgesamt 9 Stufen von 50 % - 10 % erweitern das Spektrum insofern, als dass die Detektion von Polysomen optimiert wurde.

2.4.2 Der Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe ist *in vivo* anders als *in vitro*

Für das *in vitro*-Translationssystem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat ist bereits nachgewiesen, dass die miR-122 die Bildung von 48S-Komplexen während der Translation signifikant steigert (Henke und Goergen *et al.*, 2008). Dies gilt sowohl für Translationen von kompletter HCV-Wildtyp-RNA als auch für Translationen von kurzer

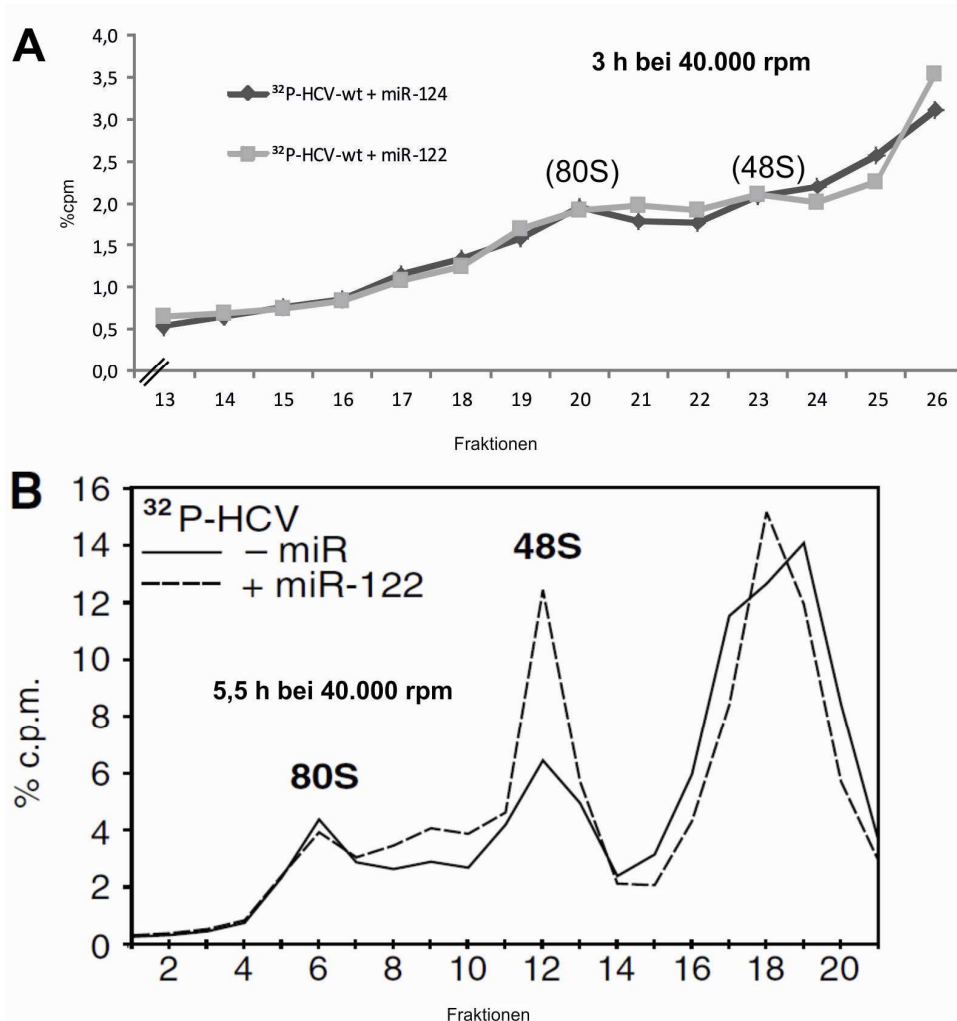


Abb. 2.4.2 Gradientenprofile von *in vivo*- und *in vitro*-Transfektionen

(A) Nach *in vivo*-Transfektionen von ^{32}P -HCV-RNA in HuH-7-Zellen (mit miR-122 oder miR-124) zeigt sich im nach Ultrazentrifugation erstellten Ausschnitt des Gradientenprofils (Fraktionen 13-26) kein Unterschied im Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe.

(B) Gradientenprofile mit ^{32}P -HCV-RNA in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (mit und ohne miR-122). Durch Zugabe von miR-122 resultiert eine deutliche Stimulierung der 48S-Komplexbildung während der Translation. Entnommen aus Henke und Goergen *et al.*, 2008.

Eine quantitativer Vergleich der Fraktionen von A und B ist nicht möglich, da diese unter anderem auf Grund von unterschiedlichen Versuchsparametern nicht kongruent sind.

HCV-RNA (96-Nukleotid-ORF, flankiert von 5′-/3′-UTR). Kinetische Analysen zeigen in der eben genannten Arbeit, dass die maximale Steigerung der Bildung von 48S-Komplexen nach spätestens 2 Minuten erreicht ist, was in einem Anstieg der 80S-Komplexe nach 4 - 6 Minuten resultiert. Ebenfalls nachgewiesen werden konnten Polysomen respektive deren vermehrter Gehalt nach einiger Zeit.

Der Nachweis der Steigerung der Menge an 48S-Komplexen und Polysomen erfolgte über Sucrose-Gradientenprofile, die mittels Ultrazentrifugation hergestellt wurden. Es erschien daher logisch, die Bildung der Translations-Initiationskomplexe auch für *in vivo*-Translationen wie in HuH-7-Zellen mit dieser Methode zu untersuchen. Die Ergebnisse liefern jedoch keinen Anhaltspunkt dafür, dass die miR-122 gesteigerte Translationseffizienz in HuH-7-Zellen auch in einer erhöhten Steigerung der Bildung von Translations-Initiationskomplexen resultiert. Auch zeigt sich kein Unterschied im Gehalt der Translations-Initiationskomplexe im Vergleich der HCV-Wildtyp-RNA mit dem um 20 Nukleotiden verlängerten HCV-Konstrukt, dessen miR-122-vermittelte Stimulierbarkeit der Translation durch die Verlängerung nicht mehr nachzuweisen ist.

Es ergibt sich die Fragestellung, warum sich bei Untersuchungen von Initiations-Translationskomplexen ein solcher Unterschied zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Translationen ergibt (siehe Abbildung 2.4.2). Zur Beantwortung muss unbedingt beachtet werden, dass sich der Mechanismus der miR-122-vermittelten Stimulierbarkeit der *in vivo*-Translation, beispielsweise in HuH-7-Zellen, grundlegend von *in vitro*-Translationen im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat unterscheidet. Grundsätzlich stimuliert die miR-122 die HCV-Translation sowohl im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat als auch in HeLa- und HuH-7-Zellen (Henke und Goergen *et al.*, 2008). Grundlegend unterschiedlich scheint aber der Mechanismus zu sein: Während im Kaninchen-Retikulozyten-Lysat die HCV-Translationseffizienz durch einzelsträngige miR-122 variabler Länge gesteigert wird, bedingt die Steigerung der HCV-Translationseffizienz in Zellen doppelsträngige miR-122 von korrekter Länge (Goergen *et al.*, 2012). Durch diesen fundamentalen Unterschied der Translationsmechanismen *in vivo* / *in vitro* erscheint die Tatsache, dass sich dieser Unterschied auch im Nachweis der Translations-Initiationskomplexe widerspiegelt, weitaus weniger verwunderlich.

3 Schlussdiskussion

3.1 Die räumliche Nähe des miRNP-Komplexes zum Stem-Loop II der HCV-IRES ist Voraussetzung für die miR-122-vermittelte Stimulation der HCV-Translationseffizienz

Werden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der 5'-UTR der HCV-IRES Nukleotid-Insertionen verschiedener Längen eingefügt und damit deren Abstand vergrößert, so resultiert eine verminderte Stimulierbarkeit der HCV-Translation durch miR-122. Andere Studien zeigen, dass Nukleotid-Insertionen noch vor dem Stem-Loop I der HCV-5'-UTR keinen Einfluss auf die Stimulierbarkeit der HCV-Translation durch die miR-122 haben (Roberts *et al.*, 2011). Eine Nukleotid-Insertion von 8 Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II zeigte keine signifikante Reduktion der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122. Die Expression der *Firefly*-Luziferase ist in diesem Versuch auf den Ko-Reporter *Renilla*-Luziferase normalisiert. Dies deckt sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen, da sich bei Normalisierung auf den Ko-Reporter auch hier bei Insertionen von 5 und 10 Nukleotiden keine signifikante Änderung der Stimulierbarkeit der Translation durch miR-122 zeigt.

Betrachtet man die bisher bekannten Mechanismen der Initiation der HCV-Translation und der Interaktion der miR-122 mit der HCV-RNA, so legt die obige Beobachtung nahe, dass es für die miR-122-vermittelte Stimulierung der HCV-Translation der räumlichen Nähe der miR-122 zur HCV-IRES bedarf. Zugleich wird die biologische Sinnhaftigkeit der Konserviertheit dieser Region untermauert. Ein Abgleich (*engl.* Alignment) der Region um die beiden miR-122-Bindestellen der HCV-5'-UTR zeigt, dass diese Region innerhalb der HCV-Subtypen hochkonserviert ist (s. Abbildung 3.1.1). Anzumerken ist, dass direkt nach der zweiten miR-122-Bindestelle die Nukleotid-Abfolge des Stem-Loops II der HCV-IRES beginnt. Zum Verständnis und zur Verdeutlichung der Zusammenhänge sind im Folgenden nochmals bisher bekannte Mechanismen der Initiation der Translation erläutert.

Der HCV-Positiv-Strang steht nach Infektion der Zelle auf Grund seiner Polarität im Zytosol direkt als Template für die Translation zur Verfügung, besitzt jedoch weder 5'-cap noch 3'-poly(A)-Schwanz. Die HCV-RNA wird stattdessen flankiert von 5'- und 3'-UTRs, welche bei der viralen Replikation und Translation eine entscheidende Rolle spielen (Liu *et al.*, 2009b; Niepmann, 2009).

	1.	2.
1a. .H77.NC_004102	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCCACACTCCACCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
1b. CN.x.AY587016.AY587016	-CCAGCCCCCTGATGGGGGCCACACTCCACCATAGAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
1c. ID.x.HC-G9.D14853	GCCAGCCCCCTGATGGGGGCCACACTCCGCCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
2a. JP.x.AY746460.AY746460	ACCCGCCCC-TAATAGGGGCCACACTCCGCCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
2b. JP.x.HC-J8.D10988	GCCCGCCCCCTGATGGGGGCCACACTCCGCCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
2c. x.x.BEBE1.D50409	ACCCGCCCC-TAAAAGGGGCCACACTCCGCCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
3a. x.x.CB.AF046866	-ACCTGCCTC-TTACGAGGGCACACTCCACCATGGAT	CACTCCCTGTGAGGAACTTC
3b. JP.x.HCV-Tr.D49374	-ACCTGCCTC-TTTCGAGGGCACACTCCACCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTTC
4a (aus Fujimura et al. 1996)	ACCTGCTCTCTATGAGAGGCACACTCCACCATGAAC	CGCTCCCTGTGAGGAACTT
4b. CA.x.QC264.FJ462435	ACCTGCTCTC-TATGAGAGCACACTCCACCATGAAC	CGCTCCCTGTGAGGAACTAC
4c. CA.x.QC381.FJ462436	ACCTGCTCTC-TATGAGAGCACACTCCACCATGAAC	CGCTCCCTGTGAGGAACTAC
4d. CA.x.QC382.FJ462437	ACCTGCTCTC-TATGAGAGCACACTCCACCATGAAC	CGCTCCCTGTGAGGAACTAC
5a (aus Li et al. 2011)	-ACCCGCCCCCTATTGGGGGCCACACTCCACCATGAAT	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
6. CN.x.GZ52557.DQ278892	GCCAGCCCC--TAATGGGGGCCACACTCCACCATGA-T	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
6b. x.x.Th580.NC_009827	GCCAGCCCC-TTAACGGGGGCCACACTCCACCATGA-T	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
6c. TH.x.Th846.EF424629	GCCAGCCCC--TAATGGGGGCCACACTCCACCATGA-T	CACTCCCTGTGAGGAACTAC
6d. VN.x.VN235.D84263	GCCAGCCCC--TAATGGGGGCCACACTCCACCATGA-T	CACTCCCTGTGAGGAACTAC

miR-122 3'-GUUUGUGGUAACAG	UGUGAGG	U-5'
miR-122 3'-GUUUGUGGUAACAGU	GUGAGG	U-5'

Abb. 3.1.1 Die miR-122-Bindestellen der HCV-5'-UTR sind hochkonserviert. Ausschnitt des Alignments der Nukleotide im Bereich der miR-122-Bindestellen verschiedener HCV-Subtypen (Quelle: <http://hcv.lanl.gov/content/index>). Die Kästchen markieren jeweils die Zielsequenzen der 1. und 2. miR-122-Bindestelle, darunter jeweils die miR-122 mit der dazu entsprechenden, eingerahmten Sequenz. Für die in der HCV-Datenbank unvollständigen Subtypen 4a und 5a siehe jeweils angegebene Veröffentlichungen.

Zur Umgehung der cap-abhängigen Translation bedient sich die HCV-RNA ihrer IRES, welche mit dem Stem-Loop II der 5'-UTR beginnt und bis einige Nukleotide in die Core-Protein-kodierende Sequenz reicht (Brown *et al.*, 1992; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993). Dabei erlaubt die IRES-Konformation die Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit ohne jegliche Initiationsfaktoren, wie sie bei der typischen eukaryotischen Translations-Initiation benötigt werden (Pestova *et al.*, 1998; Kolupaeva *et al.*, 2000; Kieft *et al.*, 2001; Spahn *et al.*, 2001; Otto *et al.*, 2004; Hellen, 2009) und trägt dabei entscheidend zur Umgehung der cap-abhängigen Translations-Initiation bei. Vielmehr sorgt die HCV-IRES für die korrekte Positionierung des Start-Codons der HCV-RNA innerhalb der ribosomalen Untereinheit (Wang *et al.*, 1995; Berry *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2011). Lediglich an der Bildung des 48S-Präinitiationskomplexes sind die eukaryotischen Initiationsfaktoren 3 (Sizova *et al.*, 1998; Buratti *et al.*, 1998), 2 (Pestova *et al.*, 1998) sowie 5 (Locker *et al.*, 2007; Terenin *et al.*, 2008) beteiligt. Besondere Bedeutung kommt hier dem Stem-Loop II der HCV-IRES zu. Dieser steht in enger räumlicher Nähe zur ribosomalen Oberfläche (Babaylova *et al.*, 2009) und induziert Konformationsänderungen der ribosomalen 40S-Untereinheit (Spahn *et al.*, 2001), was die Assoziation der 60S-Untereinheit an diesen Komplex und somit die Bildung des funktionsfähigen 80S-Ribosoms ermöglicht (Locker *et al.*, 2007; Pestova *et al.*, 2008). Die Stimulierung der HCV-Translation durch miR-122 ist mehrfach bestätigt worden (Henke und Goergen *et al.*, 2008; Jangra *et al.*,

2010; Roberts *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011; Goergen und Niepmann, 2012) und auch in dieser Arbeit anhand des transfizierten HCV-Wildtyps nachgewiesen. Während Versuche *in vitro* zeigen, dass die miR-122 Konformationsänderungen innerhalb der 5'-UTR bewirkt und diese somit für die ribosomale Assoziation verfügbar macht (Diaz-Toledano *et al.*, 2009), unterscheidet sich die Wirkungsweise in HuH-7-Zellen deutlich. Hier zeigt sich die Stimulierung der Translation erst unter Einsatz doppelsträngiger miR-122 (Goergen und Niepmann, 2012). Nachdem diese entwunden ist (Details siehe Einleitung), werden die Enden des Führungsstranges der miR-122 in einem microRNA/Protein-Komplex (miRNP) gebunden, an welchem Argonaute (Ago)-Proteine (Jinek und Doudna, 2009), besonders Ago2 (Wilson *et al.*, 2011) sowie weitere Proteine beteiligt sind (Höck *et al.*, 2007). Schaltet man Ago-Proteine aus, wird die Effizienz der HCV-Translation reduziert (Roberts *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2011). Die so exponierten Sequenzen der miR-122 können dann entsprechend an die Ziel-Sequenzen der mRNA binden. Dies führt als RNA-induzierter Silencer-Komplex (*engl.* RNA induced silencing complex, RISC) gewöhnlich bei nicht perfekter Bindung an Zielsequenzen von mRNAs zu einer Repression der Translation (Carthew und Sontheimer, 2009; Fabian *et al.*, 2010; Peters und Meister, 2007). Die Bindung dieses Komplexes an HCV-RNA resultiert jedoch in einer gesteigerten Effizienz der Translation.

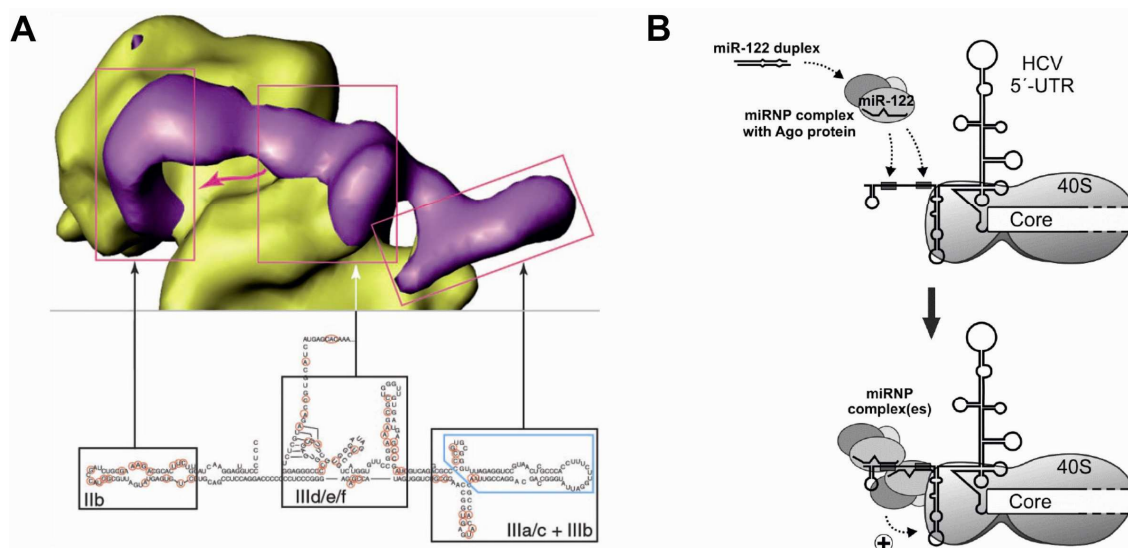


Abb. 3.1.2 Die räumliche Nähe des miRNP-Komplexes zum Stem-Loop II der HCV-IRES ist Voraussetzung für die miR-122-vermittelte Stimulation der HCV-Translationseffizienz. (A) Modell der Bindung der 40S-Untereinheit des Ribosoms an die HCV-IRES. Dabei gelangt der Stem-Loop II der HCV-IRES in enge räumliche Nähe zum mRNA-Eingangskanal (*engl. mRNA entry channel*, roter Pfeil). Entnommen aus Spahn *et al.*, 2001. **(B)** Möglicher Mechanismus der Stimulation der HCV-Translation. Nachdem der miRNP-Komplex aus miR-122 und Ago2 an die Zielsequenzen gebunden hat, resultiert eine Stimulation der HCV-Translation unter Bedingung der räumlichen Nähe zum Stem-Loop II. Entnommen aus Conrad *et al.*, 2013.

Dabei sind beide miR-122-Bindestellen für die Stimulation der Translation notwendig (Jangra *et al.*, 2010), und es werden weitere mögliche Bindungsstellen des nicht gebundenen 3'-Endes der miR-122 an die HCV-RNA diskutiert (Machlin *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2012; Goergen und Niepmann, 2012), welche zum Teil der Stabilität der HCV-RNA dienen (Shimakami *et al.*, 2012a; Shimakami *et al.*, 2012b).

Die Abbildung 3.1.2 A zeigt das Modell der Bindung der 40S-Untereinheit des Ribosoms an die HCV-IRES. Die Integration des Stem-Loop II in den Prozess der Ribosomen-Assoziation sowie die räumliche Nähe desselben zu den miR-122-Bindestellen innerhalb der HCV-5'-UTR sind besonders auffällig, die unbedingte, korrekte Konfiguration des Stem-Loop II für die Initiation der HCV-Translation sind mehrfach bestätigt worden (Spahn *et al.*, 2010; Pestova *et al.*, 2008; Locker *et al.*, 2007). Möglich wäre daher auf Grund der räumlichen Nähe eine direkte Interaktion des Stem-Loop II mit dem miRNP-Komplex während der Initiation der Translation (siehe Abbildung 3.1.2 B). Die Tatsache, dass sich das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulierung der HCV-Translation durch Vergrößerung des Abstands der miR-122-Bindestellen zum Stem-Loop II reduziert, unterstützt diese Vermutung. Ergänzend sollte zukünftig untersucht werden, wie sich die miR-122-vermittelte Stimulierung der Translation verhält, wenn man vor dem Stem-Loop II der HCV-IRES eine Insertion von 20 Nukleotiden einfügt mit solchen, die keine zusätzliche Schleife innerhalb der Sekundärstruktur bilden und die Möglichkeit für die miR-122 offen lässt, durch freie exponierte miR-122-Bindestellen weiterhin binden zu können.

3.2 Kinetische Analysen der Bildung von Translations-Initiationskomplexen *in vivo*

Optimal zur Analyse der Bildung von Translations-Initiationskomplexen ist die Untersuchung der Komplexbildung während des Fließgleichgewichts (*engl.* steady-state), da sich auf Grund der einheitlichen Bedingungen auf dieser Stufe der Translation Unterschiede in der Effektivität vergleichen lassen. Untersuchungen außerhalb des Fließgleichgewichts bilden lediglich Ist-Zustände ab, deren Vergleichbarkeit auf Grund von diversen Einflussfaktoren und Kontrollpunkten während der Komplexbildung (Acker *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2011; Marintchev *et al.*, 2004) nicht gegeben ist.

Nach Beginn der Translation und Bildung von weiteren Initiationskomplexen, die gleichzeitig an der Translation einer mRNA beteiligt sind (Polysomen), stellt sich ein

Fließgleichgewicht an dissoziierenden und assoziierenden Ribosomen ein. Die kinetische Analyse von Nelson *et al.* (1987) zeigt, dass bereits 2 Minuten nach Zugabe einer definierten Menge an Globin-mRNA zum Kaninchen-Retikulozyten-Lysat diese bereits zu 72 % mit einem Ribosomen assoziiert ist, woraufhin es zu einem Anstieg der Polysomen kommt, der nach 16 Minuten sein Maximum erreicht. Allerdings zeigen weitergehende Untersuchungen, dass um diesen Zeitpunkt der Gehalt an mRNA, die nur mit einem 80S-Komplex beladen ist, wesentlich höher ist. Andere kinetische Analysen zeigen ein Maximum der Menge an mit 80S-Komplexen beladener HCV-RNA nach ungefähr 6 Minuten, allerdings nach Zugabe von miR-122 (siehe Abbildung 3.2.1). Ohne Zugabe von miR-122 sieht man allerdings auch hier einen erst relativ späten Anstieg der Menge an 80S-Komplexen. Dies legt nahe, dass die miR-122 die

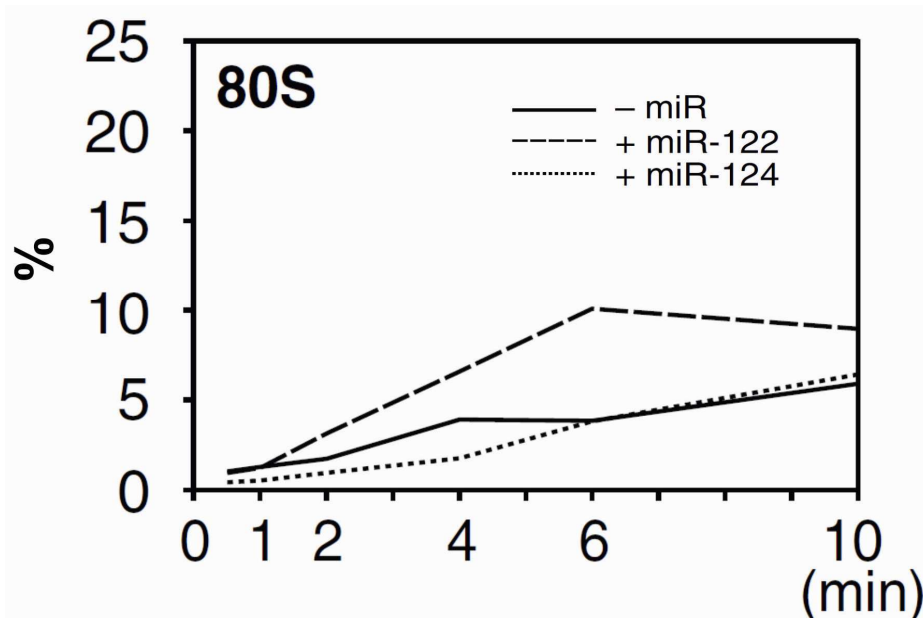


Abb. 3.2.1 Kinetische Analyse der Bildung von 80S-Translationskomplexen in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat

Der Gehalt an mit 80S-Komplexen beladener HCV-RNA während der *in vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat mit Zugabe von miR-122 erreicht bei ungefähr 6 Minuten sein Maximum und fällt danach langsam ab. Entnommen aus Henke und Goergen *et al.*, 2008.

mRNA scheinbar zugänglicher macht für Ribosomen, was den relativen Anteil von mit 80S-Komplexen beladener mRNA erhöht.

Obwohl die Assoziation des ersten Ribosoms mit der mRNA sehr rasch abläuft, dauert die Bildung der Polysomen erheblich länger (Nelson *et al.*, 1987) beziehungsweise unterscheidet sich von der ersten ribosomalen Assoziation mit der mRNA (Chiu *et al.*, 2012). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die Länge der mRNA und die

Unterschiede in der ribosomalen Initiation und Elongation die Menge an komplett beladenen Polysomen bestimmen. Mathematische Modelle der eukaryotischen Translation stützen diese These (Heinrich und Rapoport *et al.*, 1980). Zu beachten ist, dass diese Parameter generell nur in *in vitro*-Systemen untersucht sind. Auf Grund der relativ einfachen Versuchsbedingungen für *in vitro*-Translationssysteme wie das Kaninchen-Retikulozyten-Lysat lässt sich daher auch eine verlässliche kinetische Analyse der ribosomalen Assoziation anfertigen (Henke und Goergen *et al.*, 2008; Otto *et al.*, 2004).

Auf Grund der Komplexität der – bisher nicht ausreichend aufgeklärten – Vorgänge bei der intrazellulären Translation der HCV-RNA, wie sie in dieser Arbeit am Beispiel der HuH-7-Zellen untersucht wurden, ist es schwierig, mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation eine generelle Aussage über die Bildung der Translations-Initiationskomplexe beziehungsweise den Einfluss der miR-122 auf diese zu machen.

Problematisch ist die Tatsache, dass zur Durchführung von kinetischen Analysen von *in vivo*-Translationssystemen wie HuH-7-Zellen kein einheitlicher Startpunkt definiert werden kann, an welchem die Translation tatsächlich beginnt. Zu Beginn der Versuche steht die Transfektion der HCV-Reporter-RNA, die jedoch nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt komplett in der Zelle für die Translation zur Verfügung steht, da angenommen werden muss, dass die HCV-Reporter-RNA schrittweise durch das Transfektionsreagenz nach intrazellulär angeliefert wird. So steht ein Teil der HCV-Reporter-RNA früher zur Verfügung, während der andere gerade endozytiert wird oder noch extrazellulär vorliegt. Daraus folgert, dass sich nach einer bestimmten Zeit an einem RNA-Molekül zum Beispiel Polysomen gebildet haben, die Translation eines anderen Moleküls auf Grund des späteren Eintritts ins Zytosol aber erst noch initiiert werden muss. Dies macht die Definition eines Startpunktes unmöglich, wohingegen die Zugabe der HCV-Reporter-RNA zum Kaninchen-Retikulozyten-Lysat als Startpunkt definiert werden kann, da sie nicht transfiziert werden muss und somit ab deren Zugabe komplett für die Translation zur Verfügung steht, es sich also nicht unterschiedliche Stadien der Translation parallel gebildet haben.

Zur Einstellung eines Fließgleichgewichts und damit für die Definition eines Steady states sollten äußere Einflüsse ausgeschlossen werden können. Gerade für *in vivo*-Translationssysteme erscheint dies aber unmöglich. So laufen intrazellulär noch eine Vielzahl anderer, eventuell störender Reaktionen ab, die experimentell nicht kontrolliert werden können. Ebenfalls läuft die transfizierte HCV-Reporter-RNA Gefahr, bereits teilweise abgebaut zu werden, während andere Teile noch translatiert werden.

Zur Analyse der Kinetik und Bildung der Translations-Initiationskomplexe wird zu bestimmten Zeitpunkten vom mit HCV-Reporter-RNA transfizierten Kaninchen-

Retikulozyten-Lysat eine bestimmte Menge entnommen, die daraufhin mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation analysiert wird. Zu Analysen von *in vivo*-Transfektionen, wie sie in dieser Arbeit Anwendung gefunden haben, muss beachtet werden, dass die transfizierten HuH-7-Zellextrakte nicht sofort zur Verfügung stehen, sondern die Zellen vor Analyse noch lysiert werden müssen. Hier nimmt die zeitliche Komponente wesentlich Einfluss, da eine Zell-Lyse etwa 20 Minuten in Anspruch nimmt, bevor das Lysat auf den Gradienten geladen werden kann. Eine Analyse der Lysate 15 Sekunden nach Transfektion, wie sie in oben genannten kinetischen Analysen *in vitro* durchgeführt wurden, ist folglich bei einer *in vivo*-Transfektion mit dieser Methode nicht möglich. Zudem kann es durch die Lyse der HuH-7-Zellen bei unzureichender Magnesiumkonzentration bereits zu einer Dissoziation der Ribosomen kommen, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden könnten.

Bestehende kinetische Analysen für die eukaryotische, cap-abhängige Translation können nicht als Grundlage herangezogen werden, da sich diese von der IRES-vermittelten HCV-Translation wesentlich unterscheidet (Pestova *et al.*, 2001).

Diesen Überlegungen zu Folge lässt sich mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für *in vivo*-Translationen keine Aussage darüber treffen, welchen Einfluss die miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe ausübt. Vielmehr geben die Ergebnisse dieser Arbeit lediglich einen Hinweis auf den Ist-Zustand der HCV-Translation beziehungsweise auf dessen Steady-State-Level, eine generelle Aussage zum Beispiel über eine mögliche Beschleunigung der Bildung der Translations-Initiationskomplexen zu einem früheren Zeitpunkt der HCV-Translation kann jedoch nicht abgeleitet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellkultur

4.1.1.1 Zellen

Naive HuH-7-Zellen (AG Bartenschlager, Heidelberg)
humane Hepatoma-Zellen

HuH-7.5-Zellen (AG Charles M. Rice, New York)
humane Hepatoma-Zellen
(Charakterisierung siehe Blight *et al.*, 2002)

4.1.1.2 Chemikalien

Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM, farblos	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.2 Molekularbiologie

4.1.2.1 Plasmide

pHCV-FL	C. Jünemann
pHCV-FL miR122site2-5nts-stemloopII	D. Conrad
pHCV-FL miR122site2-10nts-stemloopII	D. Conrad
pHCV-FL miR122site2-20nts-stemloopII	D. Conrad
phRL-null	Promega, Mannheim

4.1.2.2 Oligonukleotide

<i>Name</i>	<i>Länge</i>	<i>Sequenz</i>
miR-122 mat	22 b	5'-(PHOS)UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG-3'
miR-122*	22 b	5'-(PHOS)ACGCCAUUAUCACACUAAUA-3'
miR-124 mat	22 b	5'-(PHOS)UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA-3'
miR-124*	22 b	5'-(PHOS)GUGUUCACAGCGGACCUUGAUU-3'
miR-122 mat	22 b	5'-(PHOS)dTGGAGdTgdTGACAAdTGGdTgdTdTdTg-3'
miR-122*	22 b	5'-(PHOS)AACGCCAdTdTAdTCACACdTAAAdTA-3'
HCMV-4986 for	27 b	5'-CCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCC-3'
HCV 3X rev	22 b	5'-ACATGATCTGCAGAGAGGCCAG-3'

4.1.2.3 Restriktionsenzyme

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>
BamHI	5' G↓GATCC 3'

4.1.2.4 Nukleotide

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
Capping Nukleotid (m7GpppG)	Promega, Mannheim
Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Ribonukleosid-Triphosphate (rNTPs)	Roche, Mannheim
[$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP	Perkin Elmer, Rodgau

4.1.2.5 Enzyme

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
GoTaq Flexi DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
T7 RNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot

HyperLadder I Bioline, Luckenwalde

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
RNeasy® MiniKit (250)	Qiagen, Hilden
NucleoBond® PC100 (Midi AX100)	Macherey-Nagel, Düren

Name	Firma
5'-Guanylyl-Imidodiphosphat	Bioscience, Jena
Acrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym, Oldenburg
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma, Taufkirchen
Cycloheximid	Sigma, Taufkirchen
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Biozym, Oldenburg
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Promega, Mannheim
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe
Nonidet® P40	AppliChem, Darmstadt
Pefabloc	Roche, Mannheim
Phenol	Sigma, Taufkirchen
Rotiszint® ecoplus	Roth, Karlsruhe
TEMED	Merck, Darmstadt
D-Luciferin	Promega, Mannheim
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Passiver Lyse-Puffer	Promega, Mannheim

WST-1 Cell Proliferation Reagent Roche, Mannheim

4.1.3 Geräte

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
CO ₂ -Brutschrank, CB-Serie	Binder, Tuttlingen
ELISA-Reader, ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Feinwaage L 2200 S	Sartorius, Göttingen
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont, USA
Geldokumentationssystem „GelDoc XR“	Biorad, München
Gelkammern	von Keutz, Reiskirchen
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik, Gehrden
Isopropanol-Tank	Quallilab, Frankreich
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge „Multifuge 3L-R“	Heraeus, Hanau
LiquidScintillationAnalyzer Tri-CARB 1500	Packard, Österreich
Luminometer, Lumat LB9501	Berthold, Bad Wildbad
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems
PCR-Thermocycler „TProfessional“	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank „LaminAir“, HA 2448 BS	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge Optima™ LE 80-K	Beckmann, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries B., New York

4.1.4 Verbrauchsmaterial

<i>Name</i>	<i>Firma</i>
ELISA-Platten (96-well)	Greiner Bio-one, Essen
Luminometerröhrchen (75 mm x 12 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (6-, 12-well)	Greiner Bio-one, Essen
Parafilm®	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, lose	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, gesteckt	Sarstedt, Nümbrecht

Plastikpipetten, steril (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme, Kodak X-omat XAR	Eastman Kodak, USA
Röntgenfilmentwickler und -fixierer	Agfa, Köln
Zellkulturflaschen (25, 50 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Passagieren von Zellen

Das Passagieren von adhärenenten Zellen in ein neues Kulturgefäß ermöglicht eine optimale Aufrechterhaltung der Zelldichte. Hierzu wird das alte Medium abgenommen und verworfen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen, das PBS daraufhin abgenommen und verworfen. Zur Ablösung der Zellen am Gefäßboden werden je nach Größe des Gefäßes 1 - 3 ml Trypsin (75 cm²-Flasks 3 ml, 25 cm²-Flasks 1 ml) zugegeben und 5 min bei 37° C inkubiert. Die Trypsinreaktion wird folgend mit mindestens doppelter Menge Nährmedium gestoppt. Die gewünschte Zellmenge wird in eine neue Flasche überführt und weiter inkubiert. Flasks mit 25 cm² Größe werden mit ungefähr 5 ml aufgefüllt, Flasks mit 75 cm² Größe mit ca. 15 ml.

4.2.1.2 Aussaat von Zellen

Für die Versuchsreihen werden die Zellen auf eine Wellplatte ausgesät. Hierzu wird das alte Medium im Flask abgenommen und verworfen. Anschließend werden die Zellen mit 3 ml PBS gewaschen, das PBS daraufhin abgenommen und verworfen. Zur Ablösung der Zellen am Gefäßboden werden je nach Größe des Gefäßes 1 - 3 ml Trypsin (75 cm²-Flasks 3 ml, 25 cm²-Flasks 1 ml) zugegeben und 5 min bei 37° C inkubiert. Die Trypsinreaktion wird folgend mit gleicher Menge Medium (Auffüllen auf 5 ml) gestoppt. Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Zählkammer Neubauer improved verwendet. 10 µl der Zellsuspension werden in der Zählkammer unter mikroskopischer Betrachtung ausgezählt. Dabei werden die Zellen innerhalb mehrerer Quadrate der Größe 1 mm³ ausgezählt, der Durchschnitt ermittelt und die Zahl mit 10.000 multipliziert. Das Ergebnis entspricht der Anzahl der Zellen pro ml. Pro Well werden die benötigten Zellen folgend auf 1 ml angesetzt und entsprechend pipettiert.

4.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.2.2.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit der Phenol-Chloroform-Extraktion kann die Template-DNA von noch vorhandenen Proteinen getrennt werden. Zur vorliegenden Template-DNA wird das gleiche Volumen Phenol gegeben, gemischt und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die entstandene obere wässrige Phase wird in ein neues Gefäß pipettiert und behalten, die untere Phase wird verworfen. Zur oberen Phase wird das gleiche Volumen Phenol und Chloroform (Chloroform:Phenol = 1:1) gegeben, gemischt und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird erneut behalten, die untere verworfen. Zur oberen Phase wird das gleiche Volumen Chloroform gegeben, gemischt und bei 13.000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die neu entstandene obere wässrige Phase wird behalten und kann entsprechend weiter bearbeitet werden, die untere Phase (Chloroform) wird verworfen.

4.2.2.2 Ethanol-Präzipitation

Zur DNA-Fällung wird nach Phenol-Chloroform-Extraktion 1/10 Vol. Na-Acetat (3 M, pH 4,8 - 5,2) sowie 3 Vol. EtOH (99 %) gegeben und gut durchmischt. Anschließend wird das Gemisch bei -20 °C für mindestens 2 Stunden inkubiert. Nach Inkubation wird für mindestens 30 min bei 13.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 500 µl EtOH (80 %) zweimal gewaschen, zwischen den Waschungen bei 13.000 rpm und 4 °C jeweils für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet bei 37 °C für ca. 15 min getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 50 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

4.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Vermehrung bzw. Herstellung der Template-DNA wurde in sämtlichen Versuchen die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration/-menge</i>
Plasmid-DNA	80 ng/μl
MgCl ₂	2,5 mM
Primer 1	1 μM
Primer 2	1 μM
dTNPs	250 μM (pro Nukleotid)
Taq-Polymerase	0,1 U/μl
Taq-Puffer	1-fach

Die Programmeinstellung wird wie folgt gewählt:

<i>Zyklus</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Beschreibung</i>
1	95 °C	2 min	Start
2	95 °C	30 s	Start
3	70 °C	1 min	Primer-Annealing
4	72 °C	1 min	für 29 Zyklen
5	72 °C	3 min	Auffüllen der Enden
6	8 °C	bis Ende	

Details

lid temperature: 100 °C

pre-heating: on

Zyklusanzahl: 30

4.2.2.4 Template-Reinigung

Zur Freisetzung von Nukleinsäure und zum Abbau von Proteinen wird nach Template-PCR das Template gereinigt. Folgender Reaktionsansatz wird verwendet:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	
CaCl ₂	2 mM
Tris-Puffer	50 mM

Proteinase K	50 mM
Template-Ansatz	(aus PCR)

Der Reaktionsansatz wird bei 37 °C im Wasserbad für 1 h inkubiert.

4.2.2.5 *In vitro*-Transkription

Zur Herstellung der gewünschten mRNA auf Basis der hergestellten Templates wird folgendes Pipettierschema verwendet:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	
Transkriptions-Puffer	1 x
DTT	10 mM
rNTPs (pro rNTP)	0,5 mM
T7-Polymerase	1 U/μl
Template	30 ng

Der Mix wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem RNeasy ® MiniKit (250) der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

4.2.2.6 Capping-Reaktion

Für die durchgeführte Kotransfektion wird mRNA benötigt, die intrazellulär cap-vermittelt translatiert wird. Zur Herstellung von mRNA mit 5'-Kappe wird folgender Reaktionsansatz verwendet:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	
Transkriptionspuffer	1 x
rNTPs (A, C, U/ G)	0,5 mM/ 0,05 mM
m ⁷ GpppG	0,5 mM
MgCl ₂	2,5 mM

DTT	10 mM
T7-RNA-Polymerase	1 U/ μ l
Template	30 ng

Der Mix wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem RNeasy ® MiniKit (250) der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

4.2.2.7 Herstellung radioaktiv markierter RNA

Die radioaktiv markierte RNA wird hergestellt nach folgendem Reaktionsansatz:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	
T-Puffer	1 x
DTT	100 mM
rNTPs (A, C, G)	25 mM
UTP	2,5 mM
³² P-UTP	10 mCi/ml
T7-Polymerase	1-fach
Template	30 ng

Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

4.2.2.8 microRNA-Duplex-Herstellung

Sowohl miR-122- als auch miR-124-Duplexe wurden nach diesem Verfahren für die Versuche hergestellt. Die einzelsträngig gelieferte microRNA wird zur Hybridisierung in einem 1:1-Verhältnis mit dem „gegenüberliegenden“ Einzelstrang gemischt und in ein 100 °C Wasserbad gegeben, bis sich dieses auf Raumtemperatur abgekühlt hat.

4.2.3 Nachweis von Nukleinsäuren

4.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung und Analyse von Proteinen und Nukleinsäuren wird die Agarose-Gelelektrophorese benutzt. Dabei wird 1 %-Agarose-Gel in der Kammer gegossen, welche anschließend mit TAE-Puffer (1-fach) aufgefüllt wird. Die zu analysierenden Proben werden mit 5 µl Ladepuffer (BX oder FM) gemischt und anschließend in die freien Taschen pipettiert. Zusätzlich wird 3 µl Marker (HyperLadder I) in eine weitere Tasche zur Skalierung pipettiert. Das Gel wird für ca. 25 min unter Spannung gesetzt (ca. 400 mA, 100 V).

Das Gel wird anschließend ca. 20 min in Ethidiumbromid zur Nukleinsäure-Färbung eingelegt und mittels Gel-Dokumentationsanlage fotografiert.

4.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung und Analyse radioaktiv markierter Ribonukleinsäuren erfolgt mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Hierzu wird zu 5 ml Acrylamid 80 µl 10 %-APS und 10 µl TEMED hinzugefügt und das Gel entsprechend der Versuchsanordnung gegossen. Die Puffertanks werden dann mit TBE-Puffer (1-fach) aufgefüllt. Je 5 µl RNA werden mit 5 µl Ladepuffer (FA) gemischt und in die Taschen pipettiert. Das Gel wird für ca. 25 min unter Spannung gesetzt (ca. 400 mA, 100 V).

Nach der Elektrophorese wird das Gel auf einen Röntgenfilm gelegt und dort ca. 5 min belassen. Nach anschließender Entwicklung und Fixierung des Films kann das so entstandene Bild analysiert werden.

4.2.4 Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 Transfektion von Zellen mit RNA

Transfektion bedeutet Einbringen von Fremd-Nukleinsäure in eukaryotische Zellen. Dabei werden die ausgesäten Zellen in der Well-Platte zuerst mit PBS gewaschen, nachdem das vorhandene Nährmedium entfernt wurde. Anschließend werden 300 µl Plain-Medium hinzugegeben.

Separat werden 100 µl Plain-Medium mit 2 µl Lipofectamine 2000 versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie 100 µl Plain-Medium mit der RNA und/oder microRNA laut Pipettierschema zusammengefügt. Die eingesetzten Mengen an RNA betragen pro Well (hier: 24-well):

400 ng Reporter-RNA

400 ng microRNA

Nach Inkubationszeit werden die beiden Mischungen laut Pipettierschema zusammengefügt und bei Raumtemperatur 20 min inkubiert, danach auf die Well-Platte entsprechend aufgetragen und für 3,5 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wird das Nährmedium abgezogen und die Wells mit PBS gewaschen. Pro Well wird nun 200 µl Ansatz, bestehend aus 196 µl DMEM und 4 µl WST-1, zugegeben und eine weitere halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubationszeit werden 100 µl abpipettiert und entsprechend der Anleitung die WST-1-Aktivität gemessen. Das verbleibende Nährmedium wird abpipettiert und die Wells zweimal mit PBS gewaschen. Nach Waschung werden 100 µl Ansatz, bestehend aus 80 µl ddH₂O und 20 µl Lyse-Puffer, pro Well aufgetragen und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert.

Das Lysat wird nun komplett abgezogen und dabei durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren die Zellen vom Wellboden gelöst. Das Lysat wird für 10 min bei 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um die festen Bestandteile der Zellreste vom zu analysierenden Lysat zu trennen.

4.2.4.2 Transfektion von Zellen mit radioaktiv markierter RNA

Separat werden 500 µl Plain-Medium mit 3 µl Lipofectamine 2000 versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert sowie 500 µl Plain-Medium mit 6 µl miR-122 (bzw. miR-124) und 600 ng ³²P-markierte RNA (Volumen entsprechend ausgerechnet) versetzt. Die beiden Ansätze werden miteinander vermischt und 20 min inkubiert. Anschließend wird der Ansatz auf das mit Zellen ausgesäte Well aufgetragen und für 2 Stunden inkubiert.

Das Nährmedium wird abgetragen und die Wells mit PBS gewaschen. 500 µl des hergestellten Puffers werden auf das Well aufgetragen und für 10 min inkubiert. Die Well-Platte wird nun konstant auf Eis gekühlt, alle Behandlungsschritte finden nun im Kühlraum bei ca. 6 °C statt. Nach Inkubationszeit wird das Lysat mit 10.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert.

4.2.4.3 Kotransfektion von Zellen

Zur Abschätzung der Zellaktivität unabhängig vom WST-1-Assay wird gecappte/polyadenylierte Ko-Reporter-RNA kotransfiziert. Dazu wird verfahren wie in Kapitel 4.2.4.1 beschrieben, zusätzlich zur eingesetzten Reporter-RNA werden 20 ng gecappter/polyadenylierter Ko-Reporter-RNA mit zum jeweiligen Reaktionsansatz gegeben.

4.2.4.4 WST-1-Messung

Zur Abschätzung der Gesamtaktivität der ausgesäten Zellen wird ein WST-1-Assay durchgeführt. Der WST-1-Assay wurde in Transfektionsversuchen zu Normalisierungszwecke herangezogen. Durch Umsetzung des Tetrazoliumsalzes in Formazan wird die Aktivität der intakten zellulären Atmungskette gemessen, die durchschnittlich ein Maß für die Gesamt-Zellmasse lebender Zellen ist. 30 Minuten vor Ende der Inkubationszeit der Transfektion wird der Überstand im Well abgenommen und dieses mit PBS gewaschen. Pro Well wird je 200 µl Ansatz hinzugegeben, bestehend aus:

196 µl DMEM, farblos

4 µl WST-1

Nach weiteren 30 min Inkubation bei 37 °C werden 100 µl abgenommen und die Absorption bei 450 nm im ELISA-Reader gemessen.

4.2.5 Protein-RNA-Wechselwirkungen

4.2.5.1 Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Zur Detektion von Ribosomen-Komplexen, die an die mRNA binden, wurde in der vorliegenden Arbeit das Prinzip der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation benutzt.

4.2.5.2 Herstellung der Gradienten

Insgesamt werden neun verschiedenprozentige Sucrose-Lösungen (10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %) benötigt.

Material	Endkonzentration
D(+)-Saccharose	
Tris-HCl (pH 8,4)	50 mM
MgCl ₂	6 mM
NaCl	60 mM

Der pH-Wert jedes Ansatzes wird gemessen und bei Bedarf auf 8,4 korrigiert.

Die Ansätze werden anschließend autoklaviert. Direkt vor dem Gießen der Gradienten werden pro Ansatz hinzugefügt:

Material	Endkonzentration
DTT	10 mM
Pefabloc	20 mM

Je 2 ml Ansatz werden mit absteigender Konzentration aufeinander pipettiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren und am Folgetag im Kühlraum bei ca. 6 °C wieder

aufgetaut. Während des Auftauens vermischen sich die einzelnen Phasen, sodass sich gut reproduzierbar ein konstantes Prozentigkeitsgefälle einstellt.

4.2.5.3 Ultrazentrifugation

Ziel der Ultrazentrifugation ist die Auftrennung der während der Transfektion intrazellulär entstandenen Translations-Initiationskomplexe (Methode beschrieben in Anthony und Merrick, 1992, sowie Niepmann, 1997). Hierfür werden die Zellen nach beschriebenem Protokoll (Kapitel 4.2.4.2) mit der radioaktiv-markierten RNA transfiziert und im Anschluss mit dem hergestellten Lyse-Puffer (s.u.) lysiert. Die gesamte Methode wurde ausnahmslos im Kühlraum bei ca. 6 °C durchgeführt.

Das zuvor bei 13.000 rpm für 5 min zentrifugierte Lysat wird nun vorsichtig auf die Gradienten aufgetragen. Dabei werden sämtliche beladene Gradienten-Röhrchen gewogen und bei Bedarf auf das gleiche Gewicht eingestellt, indem vorsichtig 10 %-Sucrose-Lösung zugegeben wird.

Die mit Lysat beladenen Gradienten werden nun für 3 h bei 4 °C mit 40.000 rpm zentrifugiert.

4.2.5.4 Fraktionierung

Zur Herstellung und Analyse eines Gradientenprofils werden die ultrazentrifugierten Gradienten anschließend in je 400 µl fraktioniert und 2 ml Rotiszint ® eco plus hinzugegeben. Die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen wird im LiquidScintillationAnalyzer (Tri-CARB 1500, Packard) in cpm (engl., *counts per minute*) gemessen (Fenster CPMB/K: 50 – 1.700 keV).

4.2.5.5 Herstellung des Lyse-Puffers

Zur Lyse der mit radioaktiv markierter RNA transfizierten Zellen wird ein spezieller Lyse-Puffer nach folgendem Ansatz hergestellt:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
ddH ₂ O	
NaCl	150 mM
MgCl ₂	30 mM
TrisHCl (pH 7,5)	20 mM
NaF	100 mM

Der Ansatz wird autoklaviert und anschließend folgende Reagenzien hinzugefügt:

<i>Material</i>	<i>Endkonzentration</i>
DTT	0,5 mM
NP40	0,5 %
Pefabloc	1 mM

4.2.5.6 Re-Extraktion

Mit der Re-Extraktion von radioaktiv markierter RNA und dem anschließenden Nachweis der RNA auf einem Polyacrylamid-Gel kann gezeigt werden, inwieweit die transfizierte, radioaktiv markierte RNA intrazellulär abgebaut wurde bzw. wie hoch der Gehalt an transfizierter RNA ist.

Hierzu wird die radioaktiv-markierte RNA (Herstellung s. Kapitel 4.2.2.7, Transfektion s. Kapitel 4.2.4.2) transfiziert und anschließend mit passivem Lyse-Puffer lysiert.

Das Lysat wird für 5 min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Zur Analyse wird das Gel auf einen Röntgenfilm analysiert.

4.2.7 Statistik

Sämtliche statistischen Wahrscheinlichkeitsangaben (p-Werte), die in dieser Arbeit angegeben sind, sind mittels Student'schem T-Test in Microsoft Excel ermittelt worden.

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Hepatitis C Virus (HCV), welches spezifisch die Leber befällt und bedeutsamster Auslöser für die chronische Hepatitis ist. Es wurde gezeigt, dass Nukleotid-Insertionen innerhalb der HCV-5'-UTR die microRNA-(miR)-122-vermittelte Stimulierung der Translation reduzieren. Zudem wurde untersucht, ob mittels Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation ein Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe nachgewiesen werden kann.

Das Hepatitis C Virus (HCV) wird in die Familie der *Flaviviridae* klassifiziert und ist Auslöser der NonA-NonB-Hepatitis. Als einzelsträngiges RNA-Virus mit Positiv-Orientierung kann es intrazellulär direkt translatiert werden, gleichwohl es nicht cap-abhängig, sondern vermittelt über die HCV-5'-IRES translatiert wird. Das Genom enthält einen offenen Leserahmen (ORF) und kodiert für ein einziges Polyprotein, welches co- und posttranslational in Struktur- und Nicht-Struktur-Proteine prozessiert wird. Der ORF wird flankiert von 5'-UTR und 3'-UTR. Die 5'-UTR ist unter den HCV-Isolaten hochkonserviert und beinhaltet unter anderem zwischen den Stem-Loops I und II die beiden miR-122-Bindestellen. Die leberspezifische miR-122 stimuliert die HCV-Translation.

Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-5'-UTR zeigt eine signifikante Reduktion der Stimulierung der Translation durch miR-122 in HuH-7-Zellen, HuH-7.5-Zellen sowie unter Verwendung von d(T)-miR-122. Die Stimulierung bleibt in sämtlichen Versuchsreihen bei einer Insertion von 20 Nukleotiden komplett aus. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Abstand zwischen miR-122-Bindestellen und der HCV-IRES für die Funktionalität der Stimulation der HCV-Translation durch miR-122 wichtig ist.

Zudem wurde in dieser Arbeit die Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für HuH-7-Zellen optimiert und mit dieser Methode der Einfluss der miR-122 auf die Bildung der Translations-Initiationskomplexe untersucht. Es wurde nachgewiesen, dass die miR-122 keinen Einfluss auf den Steady-State-Level der HCV-Translation ausübt.

Summary

This study is about Hepatitis C Virus (HCV), which specifically infects the liver and which is an important causative agent of chronic hepatitis. It is shown that nucleotide insertions in the 5'-UTR can reduce stimulation of HCV translation by microRNA-(miR)-122. Additionally, the formation of HCV initiation complexes during translation was investigated by analysis of sucrose density gradients after ultracentrifugation.

The Hepatitis C Virus is classified into the family of *Flaviviridae* and is the main causative agent of NonA-NonB hepatitis. Its single-stranded RNA virus genome can be directly translated in the cytoplasm because of its positive orientation. The translation is mediated cap-independently by the 5'-IRES which allows a direct interaction of the ribosome with the HCV RNA. The RNA genome consists of the open reading frame (ORF) and codes for one single polyprotein that is co- and posttranslationally processed into structure and non-structure proteins. The ORF is flanked by the 5'-UTR and the 3'-UTR. Among all HCV isolates the 5'-UTR is highly conserved and contains two possible miR-122 target sites. The liver-specific miR-122 stimulates HCV translation.

By increasing the distance between the second miR-122 target sequence and the base of the stem-loop II through insertion of nucleotides the miR-122 stimulation of HCV translation can be reduced in HuH-7-cells and HuH-7.5-cells, even under application of (dT)-miR-122. The insertion of 20 nucleotides completely abolishes miR-122 stimulation of HCV translation. These results show that the distance between the miR-122 binding sites and the HCV-IRES is important for the stimulation of HCV translation by the miR-122.

Moreover, the ultracentrifugation of sucrose density gradients was optimized for HuH-7-cells and is used to analyze the formation of initiation complexes during HCV translation. It is shown that miR-122 does not have any influence on steady-state level of complex formation during HCV translation initiation.

Abkürzungen und Glossar

³² P	radioaktives Phosphorisotop
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ago	Protein der Argonaute-Familie
Ampr	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp(s)	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Cap	m7-Gppp (am 5'-Ende der mRNA über eine 5'-5'-Bindung angefügtes 7-Methylguanosin)
Ci	Curie, 1 Ci = 3,7 x 10 ¹⁰ Bq (Bequerel)
cpm	<i>counts per minute</i> (registrierte Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxy-Thymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
FBS	Fötales Rinderserum
FLuc	<i>Firefly</i> -Luziferase (Luziferase aus dem Leuchtkäfer <i>Photinus pyralis</i>)
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i> (Leberzellkarzinom)
HCV	Hepatitis C Virus

hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> (heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein)
IRES	<i>internal ribosome entry site</i> (interne Ribosomen-Eintrittsstelle)
ITAF	<i>IRES trans-acting factor</i> (IRES bindender Faktor)
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LD	<i>lipid droplet</i> (Lipidvesikel)
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (Lipoprotein niederer Dichte)
μ	micro (10^{-6})
m	milli (10^{-3})
M	mol/l (molar)
mA	Milliampère (elektrische Stromstärke)
mat	<i>mature</i> (reif)
Met	Met-tRNAi
mol	Stoffmenge
miR	microRNA
miR*	zur microRNA partiell komplementärer Gegenstrang in microRNA-Duplexen
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
n	nano (10^{-9})
n.s.	nicht signifikant
NCR	<i>non-coding region</i> (nicht-kodierende Region)
nt(s)	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
p	pico (10^{-12})
P	Phosphat
PABP	Poly(A)-Bindepotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration)
PLB	<i>passive lysis buffer</i> (Lysepuffer)
Primer	einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid mit einer freien 3'-OH-Gruppe, die als Startstelle zur DNA-Kettenverlängerung genutzt werden kann

PTB	Polypyrimidin-Trakt-bindendes Protein
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (RNA-induzierter Komplex, der die mRNA-Translation inhibiert)
RLuc	<i>Renilla</i> -Luziferase (Luziferase aus der Qualle <i>Renilla reniformis</i>)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RRL	<i>rabbit reticulocyte lysate</i> (Kaninchen-Retikulozytenlysat)
RT	Raumtemperatur (ca. 20 – 25 °C)
s.	siehe
ss(+)	<i>single stranded with positive orientation</i> (einzelnsträngig mit positiver Orientierung)
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i> (kleine nukleäre Ribonukleinsäure)
Sucrose	Saccharose
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
tRNA ^{Met}	Methionin-beladene Initiator-tRNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i> (Transfer-Ribonukleinsäure)
u.a.	unter anderem
U	<i>Unit</i> (Enzym-Einheit)
U	Uracil
U/C o. UC	Uridin/Cytosin-reiche Region in der 3'-UTR der HCV RNA
Ubi	Ubiquitin-Sequenz
UE	Untereinheit
UTP	Uridintriphosphat
UTR	<i>untranslated region</i> (untranslatierter Bereich einer RNA-Sequenz)
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
VR	Variable Region (ein Bereich der 3'-UTR von HCV)
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
WST-1	<i>water soluble tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate)</i>
wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

- 1.1.1 HCV-Partikel
- 1.1.2 HCV-Genom
- 1.1.3 Infektionszyklus des HCV
 - 1.2.1 Cap-abhängige Initiation der Translation
 - 1.2.2 Beispiele der verschiedener IRES-Elemente
 - 1.2.2.1 IRES-vermittelte Initiation der HCV-Translation
 - 1.3.1 Biogenese und Funktion der microRNAs
- 2.1.1 Verwendete Konstrukte
- 2.1.2 Durch Verwendung von 400 ng miR-122 wird in HuH-7-Transfektionen die stärkste Stimulation der HCV-Translation erreicht
- 2.1.3 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der 5'-UTR der internen Ribosomen-Eintrittsstelle (*engl.* IRES) reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen
- 2.1.4 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen
- 2.1.5 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert das Ausmaß der miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7.5-Zellen
- 2.1.6 Das Einfügen von Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-IRES reduziert das Ausmaß der (dT)-miR-122-vermittelten Stimulation der Translationseffizienz in HuH-7-Zellen
- 2.2.1 Theoretische Stör- und Einflussvariablen bei der Transfektion
- 2.2.2 Stabilitäts-Assays nach HuH-7-Transfektionen
- 2.2.3 Das Ersetzen von 2'-Hydroxy-Uridin mit 2'-desoxy-Thymidin innerhalb der RNA-Sequenz verhindert die Aktivierung des Angeborenen Immunsystems
- 2.2.4 Wahrscheinliche Sekundärstrukturen der verwendeten HCV-Konstrukte
- 2.3.1 Prinzip der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation und Analyse
- 2.3.2 Die Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation über 3,0 Stunden bei 40.000 rpm und die Fraktionierung in 400 µl ergeben eine bessere Auflösung der Gradientenprofile, die für die Analyse der Translations-Initiationskomplexe benötigt wird
- 2.3.3 Identifizierung der 48S-/80S-Translations-Initiationskomplexe
- 2.3.4 Analyse der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

- 2.3.5 miR-122 hat keinen signifikanten Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe
- 2.3.6 Das Einfügen von 20 Nukleotiden zwischen zweiter miR-122-Bindestelle und Stem-Loop II der HCV-RNA hat keinen signifikanten Einfluss auf den Steady-State-Level der Translations-Initiationskomplexe während der Transfektion in HuH-7-Zellen
- 2.4.1 Optimierte Parameter der Sucrose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation für HuH-7-Zell-Extrakte
- 2.4.2 Gradientenprofile von *in vivo*- und *in vitro*-Transfektionen
- 3.1.1 Die miR-122-Bindestellen der HCV-5'-UTR sind hochkonserviert
- 3.1.2 Die räumliche Nähe des miRNP-Komplexes zum Stem-Loop II der HCV-IRES ist Voraussetzung für die miR-122-vermittelte Stimulation der HCV-Translationseffizienz
- 3.2.1 Kinetische Analyse der Bildung von 80S-Translations-Initiationskomplexen in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat

Tabellenverzeichnis

- 1.1.1 Nicht-Strukturproteine des ORF des HCV-Genoms
- 1.2.1 Eukaryotische Initiationsfaktoren der Translation
- 1.2.3 Zelluläre Proteine, die mit der HCV-IRES interagieren

Literaturverzeichnis

- Acker, M. G., B. S. Shin, et al. (2009). "Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation." *Journal of Molecular Biology* 385(2): 491-506.
- Agnello, V., G. Abel, et al. (1999). "Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(22): 12766-12771.
- Aitken, C. E. and J. R. Lorsch (2012). "A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes." *Nature Structural & Molecular Biology* 19(6): 568-576.
- Ali, N. and A. Siddiqui (1997). "The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(6): 2249-2254.
- Ameres, S. L., J. Martinez, et al. (2007). "Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC." *Cell* 130(1): 101-112.
- Andre, P., G. Perlemuter, et al. (2005). "Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism." *Seminars in Liver Disease* 25(1): 93-104.
- Anthony, D. D. and W. C. Merrick (1992). "Analysis of 40 S and 80 S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition." *The Journal of Biological Chemistry* 267(3): 1554-1562.
- Appel, N., T. Schaller, et al. (2006). "From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication." *The Journal of Biological Chemistry* 281(15): 9833-9836.
- Ashfaq, U. A., T. Javed, et al. (2011). "An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses." *Virology Journal* 8: 161.
- Asselah, T., L. Rubbia-Brandt, et al. (2006). "Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter?" *Gut* 55(1): 123-130.
- Babaylova, E., D. Graifer, et al. (2009). "Positioning of subdomain III_d and apical loop of domain II of the hepatitis C IRES on the human 40S ribosome." *Nucleic Acids Research* 37(4): 1141-1151.
- Bai, S., M. W. Nasser, et al. (2009). "MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib." *The Journal of Biological Chemistry* 284(46): 32015-32027.
- Baird, S. D., M. Turcotte, et al. (2006). "Searching for IRES." *RNA* 12(10): 1755-1785.
- Barreau, C., S. Dutertre, et al. (2006). "Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution." *RNA* 12(10): 1790-1793.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-297.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136(2): 215-233.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, et al. (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." *Journal of Virology* 68(8): 5045-5055.
- Bartenschlager, R., F. L. Cosset, et al. (2010). "Hepatitis C virus replication cycle." *Journal of Hepatology* 53(3): 583-585.
- Bartenschlager, R. and V. Lohmann (2000). "Replication of hepatitis C virus." *The Journal of General Virology* 81(Pt 7): 1631-1648.
- Bartenschlager, R., F. Penin, et al. (2011). "Assembly of infectious hepatitis C virus particles." *Trends in Microbiology* 19(2): 95-103.
- Behrens, S. E., L. Tomei, et al. (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *The EMBO Journal* 15(1): 12-22.
- Benga, W. J., S. E. Krieger, et al. (2010). "Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles." *Hepatology* 51(1): 43-53.

- Bentwich, I., A. Avniel, et al. (2005). "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs." *Nature Genetics* 37(7): 766-770.
- Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Molecular Cell* 28(2): 328-336.
- Berry, K. E., S. Waghray, et al. (2010). "The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit." *RNA* 16(8): 1559-1569.
- Berry, K. E., S. Waghray, et al. (2011). "Crystal structure of the HCV IRES central domain reveals strategy for start-codon positioning." *Structure* 19(10): 1456-1466.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, et al. (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." *Cell* 125(6): 1111-1124.
- Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." *Journal of Virology* 80(14): 6964-6972.
- Blight, K. J., J. A. McKeating, et al. (2002). "Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication." *Journal of Virology* 76(24): 13001-13014.
- Borman, A. and R. J. Jackson (1992). "Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site." *Virology* 188(2): 685-696.
- Boulant, S., R. Montserret, et al. (2006). "Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *The Journal of Biological Chemistry* 281(31): 22236-22247.
- Bradrick, S. S., R. W. Walters, et al. (2006). "The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase." *Nucleic Acids Research* 34(4): 1293-1303.
- Brown, E. A., H. Zhang, et al. (1992). "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs." *Nucleic Acids Research* 20(19): 5041-5045.
- Bung, C., Z. Bochkaeva, et al. (2010). "Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation." *FEBS Letters* 584(4): 837-842.
- Buratti, E., S. Tisminetzky, et al. (1998). "Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3." *Nucleic Acids Research* 26(13): 3179-3187.
- Burlone, M. E. and A. Budkowska (2009). "Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors." *The Journal of General Virology* 90(Pt 5): 1055-1070.
- Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23: 175-205.
- Carthew, R. W. and E. J. Sontheimer (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136(4): 642-655.
- Chang, J., E. Nicolas, et al. (2004). "miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1." *RNA Biology* 1(2): 106-113.
- Chang, K. S., J. Jiang, et al. (2007). "Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture." *Journal of Virology* 81(24): 13783-13793.
- Chekulaeva, M. and W. Filipowicz (2009). "Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells." *Current Opinion in Cell Biology* 21(3): 452-460.
- Chen, X. (2004). "A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development." *Science* 303(5666): 2022-2025.
- Cheung, Y. N., D. Maag, et al. (2007). "Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo." *Genes & Development* 21(10): 1217-1230.

- Chiu SY, F. L., AC Ranganathan, et al. (2012). "The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex." *Genes & Development* (18): 745-754.
- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* 244(4902): 359-362.
- Conrad KD, F Giering, et al., (2013). "MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation." *PLoS One* 8(2): e56272.
- Coulouarn, C., V. M. Factor, et al. (2009). "Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties." *Oncogene* 28(40): 3526-3536.
- Cullen, B. R. (2006). "Viruses and microRNAs." *Nature Genetics* 38 Suppl: S25-30.
- Diaz-Toledano, R., A. Ariza-Mateos, et al. (2009). "In vitro characterization of a miR-122-sensitive double-helical switch element in the 5' region of hepatitis C virus RNA." *Nucleic Acids Research* 37(16): 5498-5510.
- Diebold, S. S., C. Massacrier, et al. (2006). "Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides." *European Journal of Immunology* 36(12): 3256-3267.
- Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. (2003) in: "siRNAs can function as miRNAs." *Genes Dev.* ;17(4):438-42.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." *Genes & Development* 18(5): 504-511.
- Donahue, T.F. in *Translational Control of Gene Expression* (eds Sonenberg, N., Hershey, J. W.B. & Mathews, M.B.) 487-502 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000).
- Du, T. and P. D. Zamore (2005). "microPrimer: the biogenesis and function of microRNA." *Development* 132(21): 4645-4652.
- Esau, C., S. Davis, et al. (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." *Cell Metabolism* 3(2): 87-98.
- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, et al. (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(1): 9-22.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." *Cell* 132(1): 9-14.
- Evans, M. J., T. von Hahn, et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* 446(7137): 801-805.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, et al. (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." *Annual Review of Biochemistry* 79: 351-379.
- Failla, C., L. Tomei, et al. (1995). "An amino-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protease is essential for interaction with NS4A." *Journal of Virology* 69(3): 1769-1777.
- Fan, C. G., C. M. Wang, et al. (2011). "miR-122 inhibits viral replication and cell proliferation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma and targets NDRG3." *Oncology Reports* 26(5): 1281-1286.
- Fehr, C., K. D. Conrad, et al. (2012). "Differential stimulation of hepatitis C virus RNA translation by microRNA-122 in different cell cycle phases." *Cell Cycle* 11(2): 277-285.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nature Reviews Genetics* 9(2): 102-114.
- Filipowicz, W., L. Jaskiewicz, et al. (2005). "Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs." *Current Opinion in structural Biology* 15(3): 331-341.

- Fraser, C. S., K. E. Berry, et al. (2007). "eIF3j is located in the decoding center of the human 40S ribosomal subunit." *Molecular Cell* 26(6): 811-819.
- Fraser, C. S. and J. A. Doudna (2007). "Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation." *Nature Reviews Microbiology* 5(1): 29-38.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." *Journal of Virology* 76(11): 5326-5338.
- Friebe, P., V. Lohmann, et al. (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." *Journal of Virology* 75(24): 12047-12057.
- Fu, H., Y. Tie, et al. (2005). "Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method." *FEBS Letters* 579(17): 3849-3854.
- Fujimura, Y., S. Ishimoto, et al. (1996). "Genotypes and multiple infections with hepatitis C virus in patients with haemophilia A in Japan." *Journal of Viral Hepatitis* 3(2): 79-84.
- Furuichi, Y. and A. J. Shatkin (2000). "Viral and cellular mRNA capping: past and prospects." *Advances in Virus Research* 55: 135-184.
- Gosert, R., K. H. Chang, et al. (2000). "Transient expression of cellular polypyrimidine-tract binding protein stimulates cap-independent translation directed by both picornaviral and flaviviral internal ribosome entry sites *In vivo*." *Molecular and Cellular Biology* 20(5): 1583-1595.
- Goss, D. J. and T. Harrigan (1986). "Magnesium ion dependent equilibria, kinetics, and thermodynamic parameters of *Artemia* ribosome dissociation and subunit association." *Biochemistry* 25(12): 3690-3695.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." *Journal of Virology* 67(5): 2832-2843.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(22): 10583-10587.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Letters* 535(1-3): 34-38.
- Griffin, S. D., R. Harvey, et al. (2004). "A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria." *The Journal of General Virology* 85(Pt 2): 451-461.
- Gross, J. D., N. J. Moerke, et al. (2003). "Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E." *Cell* 115(6): 739-750.
- Hahm, B., Y. K. Kim, et al. (1998). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L interacts with the 3' border of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." *Journal of Virology* 72(11): 8782-8788.
- Heinrich, R. and T. A. Rapoport (1980). "Mathematical modelling of translation of mRNA in eucaryotes; steady state, time-dependent processes and application to reticulocytes." *Journal of Theoretical Biology* 86(2): 279-313.
- Hellen, C. U. (2009). "IRES-induced conformational changes in the ribosome and the mechanism of translation initiation by internal ribosomal entry." *Biochimica et Biophysica Acta* 1789(9-10): 558-570.
- Hellen, C. U. and P. Sarnow (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." *Genes & Development* 15(13): 1593-1612.
- Henke, J. I., D. Goergen, et al. (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." *The EMBO Journal* 27(24): 3300-3310.
- Hijikata, M., N. Kato, et al. (1991). "Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by *in vitro* processing analysis." *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America 88(13): 5547-5551.
- Hijikata, M., H. Mizushima, et al. (1993). "Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus." *Journal of Virology* 67(8): 4665-4675.
- Höck, J., L. Weinmann, et al. (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." *EMBO Reports* 8(11): 1052-1060.
- Hoffman, B. and Q. Liu (2011). "Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals." *Liver international : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 31(10): 1449-1467.
- Hraber, P. T., W. Fischer, et al. (2006). "Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes." *Virology Journal* 3: 103.
- Hutvagner, G. and M. J. Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." *Nature reviews Molecular Cell Biology* 9(1): 22-32.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." *Science* 297(5589): 2056-2060.
- Jackson, R. J. (1991). "The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 200(2): 285-294.
- Jackson, R. J., C. U. Hellen, et al. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(2): 113-127.
- Jang, S. K. (2006). "Internal initiation: IRES elements of picornaviruses and hepatitis C virus." *Virus Research* 119(1): 2-15.
- Jang, S. K., H. G. Kräusslich, et al. (1988). "A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation." *Journal of Virology* 62(8): 2636-2643.
- Jangra, R. K., M. Yi, et al. (2010). "Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122." *Journal of Virology* 84(13): 6615-6625.
- Jiang, J. and G. Luo (2009). "Apolipoprotein E but not B is required for the formation of infectious hepatitis C virus particles." *Journal of Virology* 83(24): 12680-12691.
- Jinek, M. and J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." *Nature* 457(7228): 405-412.
- Jopling, C. (2012). "Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function." *RNA Biology* 9(2): 137-142.
- Jopling, C. L., S. Schutz, et al. (2008). "Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome." *Cell Host & Microbe* 4(1): 77-85.
- Jopling, C. L., M. Yi, et al. (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." *Science* 309(5740): 1577-1581.
- Kato, H., O. Takeuchi, et al. (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." *Nature* 441(7089): 101-105.
- Khaliq, S., S. Jahan, et al. (2011). "Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target." *Liver international: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 31(5): 606-617.
- Kieft, J. S., K. Zhou, et al. (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." *RNA* 7(2): 194-206.
- Kim, J. H., B. Hahm, et al. (2000). "Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm." *Journal of Molecular Biology* 298(3): 395-405.
- Kim, J. H., K. Y. Paek, et al. (2004). "A cellular RNA-binding protein enhances internal ribosomal entry site-dependent translation through an interaction downstream

- of the hepatitis C virus polyprotein initiation codon." *Molecular and Cellular Biology* 24(18): 7878-7890.
- Kolupaeva, V. G., T. V. Pestova, et al. (2000). "An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus." *Journal of Virology* 74(14): 6242-6250.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, et al. (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *Journal of Virology* 70(6): 3363-3371.
- Kolykhalov, A. A., K. Mihalik, et al. (2000). "Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo." *Journal of Virology* 74(4): 2046-2051.
- Koutsoudakis, G., A. Kaul, et al. (2006). "Characterization of the early steps of hepatitis C virus infection by using luciferase reporter viruses." *Journal of Virology* 80(11): 5308-5320.
- Kozak, M. (1991). "Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation." *The Journal of Biological Chemistry* 266(30): 19867-19870.
- Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Research* 39 (Database issue): D152-157.
- Krekulova, L., V. Rehak, et al. (2006). "Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after." *Folia Microbiologica* 51(6): 665-680.
- Kuhn, R., N. Luz, et al. (1990). "Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus." *Journal of Virology* 64(10): 4625-4631.
- Kutay, H., S. Bai, et al. (2006). "Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas." *Journal of Cellular Biochemistry* 99(3): 671-678.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Current Biology: CB* 12(9): 735-739.
- Landgraf, P., M. Rusu, et al. (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." *Cell* 129(7): 1401-1414.
- Lee, H. K., J. M. Lund, et al. (2007). "Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells." *Science* 315(5817): 1398-1401.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science* 294(5543): 862-864.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-854.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* 120(1): 15-20.
- Li, Y. P., J. M. Gottwein, et al. (2011). "MicroRNA-122 antagonism against hepatitis C virus genotypes 1-6 and reduced efficacy by host RNA insertion or mutations in the HCV 5' UTR." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(12): 4991-4996.
- Lin, C., B. D. Lindenbach, et al. (1994). "Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini." *Journal of Virology* 68(8): 5063-5073.
- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." *Science* 309(5734): 623-626.
- Lindenbach B.D., Rice C.M. (2001): *Flaviviridae: the viruses and their replication*, pp. 991-1041 in D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin: *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia (USA).
- Liu, H. M., H. Aizaki, et al. (2009). "SYNCRIP (synaptotagmin-binding, cytoplasmic RNA-interacting protein) is a host factor involved in hepatitis C virus RNA replication." *Virology* 386(2): 249-256.

- Liu, J., M.A. Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305(5689): 1437-1441.
- Liu, S., W. Yang, et al. (2009a). "Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection." *Journal of Virology* 83(4): 2011-2014.
- Liu, Y., E. Wimmer, et al. (2009b). "Cis-acting RNA elements in human and animal plus-strand RNA viruses." *Biochimica et Biophysica Acta* 1789(9-10): 495-517.
- Locker, N., L. E. Easton, et al. (2006). "Affinity purification of eukaryotic 48S initiation complexes." *RNA* 12(4): 683-690.
- Locker, N., L. E. Easton, et al. (2007). "HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly." *The EMBO Journal* 26(3): 795-805.
- Maag, D., M. A. Algire, et al. (2006). "Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection." *Journal of Molecular Biology* 356(3): 724-737.
- Maag, D., C. A. Fekete, et al. (2005). "A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon." *Molecular Cell* 17(2): 265-275.
- Machlin, E. S., P. Sarnow, et al. (2011). "Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(8): 3193-3198.
- Man, N., Y. Chen, et al. (2010). "Induction of genuine autophagy by cationic lipids in mammalian cells." *Autophagy* 6(4).
- Maraia, R. J. and T. N. Lamichhane (2011). "3' processing of eukaryotic precursor tRNAs." *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 2(3): 362-375.
- Marintchev, A. and G. Wagner (2004). "Translation initiation: structures, mechanisms and evolution." *Quarterly Reviews of Biophysics* 37(3-4): 197-284.
- Marques, J. T., T. Devosse, et al. (2006). "A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells." *Nature Biotechnology* 24(5): 559-565.
- Martinez-Salas, E., D. Pineiro, et al. (2012). "Alternative Mechanisms to Initiate Translation in Eukaryotic mRNAs." *Comparative and Functional Genomics* 2012: 391546.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, et al. (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *The EMBO Journal* 21(15): 3980-3988.
- Meylan, E. and J. Tschoop (2006). "Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses." *Molecular Cell* 22(5): 561-569.
- Meylan, E., J. Tschoop, et al. (2006). "Intracellular pattern recognition receptors in the host response." *Nature* 442(7098): 39-44.
- Mizushima, H., M. Hijikata, et al. (1994). "Two hepatitis C virus glycoprotein E2 products with different C termini." *Journal of Virology* 68(10): 6215-6222.
- Mo, R. H., J. L. Zaro, et al. (2012). "Effects of Lipofectamine 2000/siRNA complexes on autophagy in hepatoma cells." *Molecular Biotechnology* 51(1): 1-8.
- Moradpour, D., F. Penin, et al. (2007). "Replication of hepatitis C virus." *Nature Reviews Microbiology* 5(6): 453-463.
- Muthukrishnan, S., G. W. Both, et al. (1975). "5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation." *Nature* 255(5503): 33-37.
- Nelson, E. M. and M. M. Winkler (1987). "Regulation of mRNA entry into polysomes. Parameters affecting polysome size and the fraction of mRNA in polysomes." *The Journal of Biological Chemistry* 262(24): 11501-11506.
- Niepmann, M. (2009). "Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA." *Cell Cycle* 8(10): 1473-1477.

- Niepmann, M. (2009). "Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus." *Biochimica et Biophysica Acta* 1789(9-10): 529-541.
- Niepmann, M., A. Petersen, et al. (1997). "Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus." *Journal of Virology* 71(11): 8330-8339.
- Nilsen, T. W. (2007). "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells." *Trends in Genetics: TIG* 23(5): 243-249.
- Oh, J. E. and H. K. Lee (2012). "Modulation of pathogen recognition by autophagy." *Frontiers in Immunology* 3: 44.
- Okamura, K., J. W. Hagen, et al. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*." *Cell* 130(1): 89-100.
- Otto, G. A. and J. D. Puglisi (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation." *Cell* 119(3): 369-380.
- Pacheco, A., S. Lopez de Quinto, et al. (2009). "A novel role for Gemin5 in mRNA translation." *Nucleic Acids Research* 37(2): 582-590.
- Paek, K. Y., C. S. Kim, et al. (2008). "RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA." *Journal of Virology* 82(24): 12082-12093.
- Pang, P. S., E. A. Pham, et al. (2012). "Structural map of a microRNA-122: hepatitis C virus complex." *Journal of Virology* 86(2): 1250-1254.
- Park, S. M., K. Y. Paek, et al. (2011). "Translation-competent 48S complex formation on HCV IRES requires the RNA-binding protein NSAP1." *Nucleic Acids Research* 39(17): 7791-7802.
- Parker, R. and U. Sheth (2007). "P bodies and the control of mRNA translation and degradation." *Molecular Cell* 25(5): 635-646.
- Passmore, L. A., T. M. Schmeing, et al. (2007). "The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome." *Molecular Cell* 26(1): 41-50.
- Paulin, F. E., L. E. Campbell, et al. (2001). "Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein." *Current Biology: CB* 11(1): 55-59.
- Pawlotsky, J. M. (2003). "Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications." *Clinics in Liver Disease* 7(1): 45-66.
- Pelletier, J. and N. Sonenberg (1988). "Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA." *Nature* 334(6180): 320-325.
- Penin, F. (2003). "Structural biology of hepatitis C virus." *Clinics in Liver Disease* 7(1): 1-21, vii.
- Penin, F., V. Brass, et al. (2004). "Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *The Journal of Biological Chemistry* 279(39): 40835-40843.
- Pestova, T. V., S. de Breyne, et al. (2008). "eIF2-dependent and eIF2-independent modes of initiation on the CSFV IRES: a common role of domain II." *The EMBO Journal* 27(7): 1060-1072.
- Pestova, T. V., C. U. Hellen, et al. (1996). "Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry." *Molecular and Cellular Biology* 16(12): 6859-6869.
- Pestova, T. V. and V. G. Kolupaeva (2002). "The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection." *Genes & Development* 16(22): 2906-2922.
- Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, et al. (2001). "Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13): 7029-7036.

- Pestova, T. V., I. N. Shatsky, et al. (1998). "A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs." *Genes & Development* 12(1): 67-83.
- Peters, L. and G. Meister (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." *Molecular Cell* 26(5): 611-623.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* 282(5390): 938-941.
- Pisarev, A. V., V. G. Kolupaeva, et al. (2008). "Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes." *The EMBO Journal* 27(11): 1609-1621.
- Pisarev, A. V., N. E. Shirokikh, et al. (2005). "Translation initiation by factor-independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites." *Comptes Rendus Biologies* 328(7): 589-605.
- Ploss, A. and C. M. Rice (2009). "Towards a small animal model for hepatitis C." *EMBO Reports* 10(11): 1220-1227.
- Pudi, R., P. Srinivasan, et al. (2004). "La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation." *The Journal of Biological Chemistry* 279(29): 29879-29888.
- Rana, T. M. (2007). "Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8(1): 23-36.
- Randall, G., A. Grakoui, et al. (2003). "Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(1): 235-240.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 403(6772): 901-906.
- Rice, C. M. (2011). "New insights into HCV replication: potential antiviral targets." *Topics in Antiviral Medicine* 19(3): 117-120.
- Roberts, A. P., A. P. Lewis, et al. (2011). "miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components." *Nucleic Acids Research* 39(17): 7716-7729.
- Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." *Nature* 448(7149): 83-86.
- Sachs, A. B. and G. Varani (2000). "Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story." *Nature Structural Biology* 7(5): 356-361.
- Saito, T., D. M. Owen, et al. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." *Nature* 454(7203): 523-527.
- Santolini, E., L. Pacini, et al. (1995). "The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide." *Journal of Virology* 69(12): 7461-7471.
- Saxena, S., Z. O. Jonsson, et al. (2003). "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells." *The Journal of Biological Chemistry* 278(45): 44312-44319.
- Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." *The EMBO Journal* 21(19): 5017-5025.
- Scheller, N., L. B. Mina, et al. (2009). "Translation and replication of hepatitis C virus genomic RNA depends on ancient cellular proteins that control mRNA fates." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32): 13517-13522.
- Schlee, M., E. Hartmann, et al. (2009). "Approaching the RNA ligand for RIG-I?" *Immunological Reviews* 227(1): 66-74.

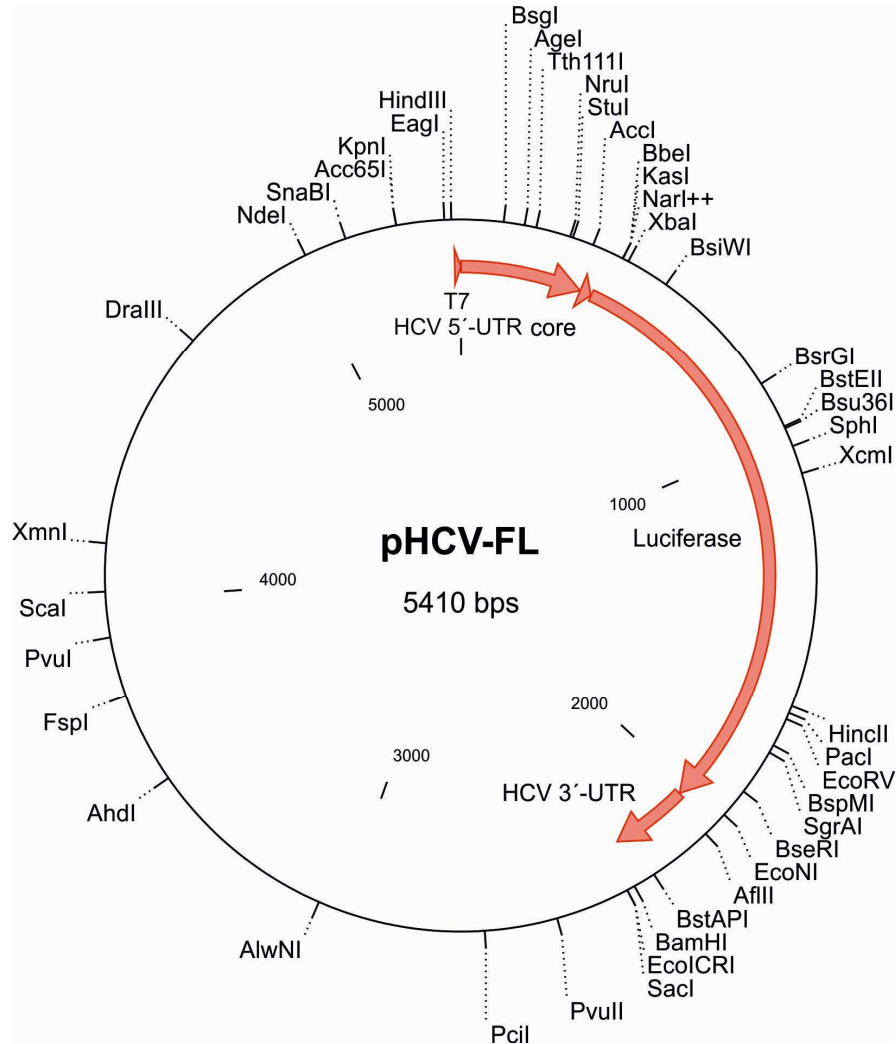
- Schneider-Poetsch, T., J. Ju, et al. (2010). "Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin." *Nature Chemical Biology* 6(3): 209-217.
- Sempere, L. F., S. Freemantle, et al. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." *Genome Biology* 5(3): R13.
- Shimakami, T., D. Yamane, et al. (2012a). "Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2-miR-122 complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(3): 941-946.
- Shimakami, T., D. Yamane, et al. (2012b). "Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus." *Journal of Virology* 86(13): 7372-7383.
- Simmonds, P. (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." *The Journal of General Virology* 82(Pt 4): 693-712.
- Simmonds, P. (2004). "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on." *The Journal of General Virology* 85(Pt 11): 3173-3188.
- Simmonds, P., J. Bukh, et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* 42(4): 962-973.
- Sioud, M. (2006). "Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses." *European Journal of Immunology* 36(5): 1222-1230.
- Sioud, M. (2010). "Recent advances in small interfering RNA sensing by the immune system." *New Biotechnology* 27(3): 236-242.
- Siridechadilok, B., C. S. Fraser, et al. (2005). "Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis." *Science* 310(5753): 1513-1515.
- Sizova, D. V., V. G. Kolupaeva, et al. (1998). "Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs." *Journal of Virology* 72(6): 4775-4782.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." *Cell* 136(4): 731-745.
- Sonenberg, N., K. M. Rupprecht, et al. (1979). "Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(9): 4345-4349.
- Song, Y., P. Friebe, et al. (2006). "The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site." *Journal of Virology* 80(23): 11579-11588.
- Sontheimer, E. J. (2005). "Assembly and function of RNA silencing complexes." *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 6(2): 127-138.
- Spahn, C. M., J. S. Kieft, et al. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." *Science* 291(5510): 1959-1962.
- Sumpter, R., Jr., Y. M. Loo, et al. (2005). "Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I." *Journal of Virology* 79(5): 2689-2699.
- Svitkin, Y. V., A. Pause, et al. (2001). "The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure." *RNA* 7(3): 382-394.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *International Immunology* 17(1): 1-14.
- Tanaka, T., N. Kato, et al. (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." *Journal of Virology* 70(5): 3307-3312.
- Tang, H. and H. Grise (2009). "Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis." *Clinical Science* 117(2): 49-65.

- Tanji, Y., M. Hijikata, et al. (1995). "Hepatitis C virus-encoded nonstructural protein NS4A has versatile functions in viral protein processing." *Journal of Virology* 69(3): 1575-1581.
- Tarr, A. W., R. A. Urbanowicz, et al. (2012). "The role of humoral innate immunity in hepatitis C virus infection." *Viruses* 4(1): 1-27.
- Terenin, I. M., S. E. Dmitriev, et al. (2008). "Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2." *Nature Structural & Molecular Biology* 15(8): 836-841.
- Thiel H.J. et al. in *Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (eds Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L.A.) 979-996 (Academic Press, 2005).
- Tischendorf, J. J., C. Beger, et al. (2004). "Polypyrimidine tract-binding protein (PTB) inhibits Hepatitis C virus internal ribosome entry site (HCV IRES)-mediated translation, but does not affect HCV replication." *Archives of Virology* 149(10): 1955-1970.
- Tolia, N. H. and L. Joshua-Tor (2007). "Slicer and the argonautes." *Nature Chemical Biology* 3(1): 36-43.
- Tomei, L., C. Failla, et al. (1996). "A central hydrophobic domain of the hepatitis C virus NS4A protein is necessary and sufficient for the activation of the NS3 protease." *The Journal of General Virology* 77 (Pt 5): 1065-1070.
- Tscherne, D. M., C. T. Jones, et al. (2006). "Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry." *Journal of Virology* 80(4): 1734-1741.
- Tsukiyama-Kohara, K., N. Iizuka, et al. (1992). "Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA." *Journal of Virology* 66(3): 1476-1483.
- Villanueva, R. A., R. K. Jangra, et al. (2010). "miR-122 does not modulate the elongation phase of hepatitis C virus RNA synthesis in isolated replicase complexes." *Antiviral Research* 88(1): 119-123.
- Volpon, L., M. J. Osborne, et al. (2006). "Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands." *The EMBO Journal* 25(21): 5138-5149.
- Wakita, T., T. Pietschmann, et al. (2005). "Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome." *Nature Medicine* 11(7): 791-796.
- Wang, C., S. Y. Le, et al. (1995). "An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region." *RNA* 1(5): 526-537.
- Wang, C., P. Sarnow, et al. (1993). "Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism." *Journal of Virology* 67(6): 3338-3344.
- Weinlich, S., S. Hüttelmaier, et al. (2009). "IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR." *RNA* 15(8): 1528-1542.
- Wilson, J. A., C. Zhang, et al. (2011). "Human Ago2 is required for efficient microRNA 122 regulation of hepatitis C virus RNA accumulation and translation." *Journal of Virology* 85(5): 2342-2350.
- World Health Organization (2011) in *Weekly epidemiological record: Hepatitis C*.(86): 445-456
- Wozniak, A. L., S. Griffin, et al. (2010). "Intracellular proton conductance of the hepatitis C virus p7 protein and its contribution to infectious virus production." *PLoS Pathogens* 6(9): e1001087.
- Xie, X., J. Lu, et al. (2005). "Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals." *Nature* 434(7031): 338-345.
- Yanagi, M., M. St Claire, et al. (1999). "In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone."

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(5): 2291-2295.
- Yekta, S., I. H. Shih, et al. (2004). "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA." Science 304(5670): 594-596.
- Yi, M. and S. M. Lemon (2003). "3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA." Journal of Virology 77(6): 3557-3568.

Anhang

Plasmid pHCV-FL

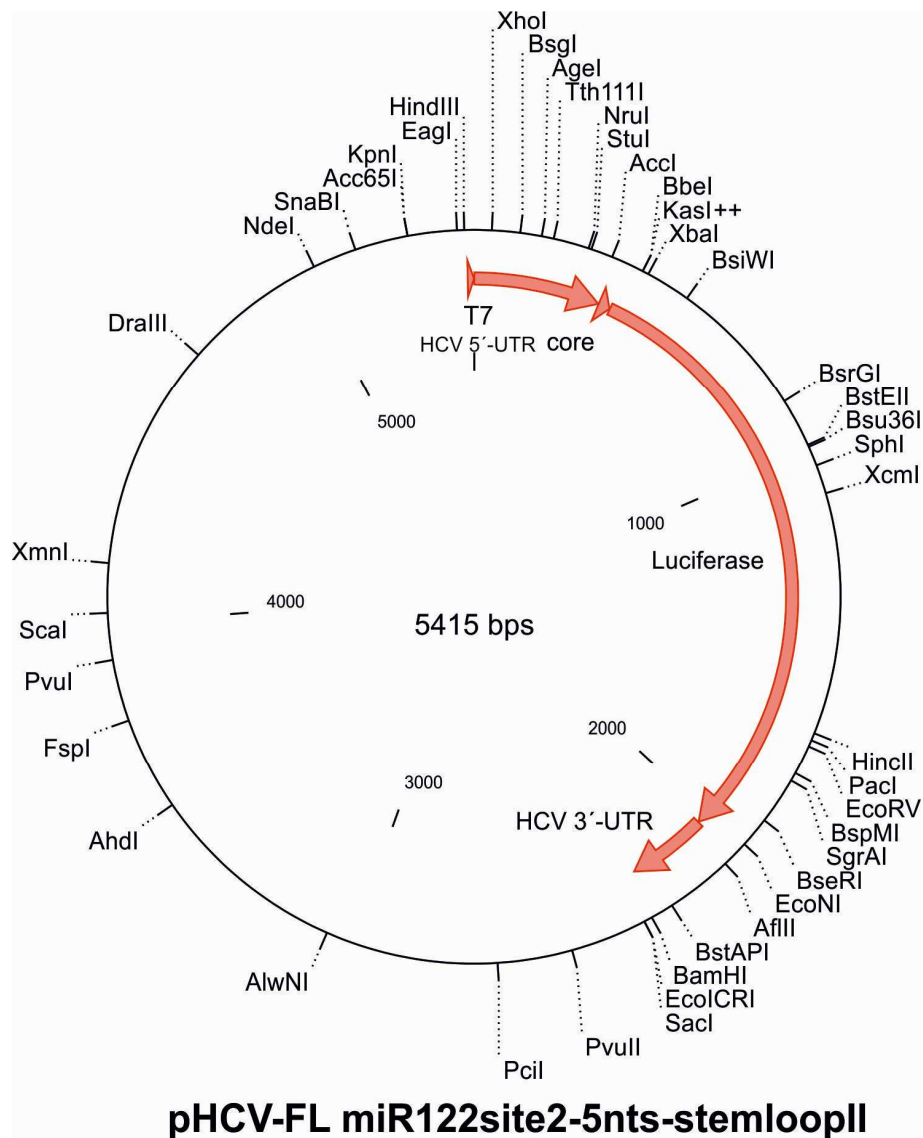


Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	5393	5410
HCV-5'-UTR	1	341
miR-122 site 1	21	27
miR-122 site 2	37	42
stem loop II	43	117
core	342	374
Luciferase	375	2027
HCV-3'-UTR	2028	2248

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfach vorhandenen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-UTR des HCV, ein Teil der Core-kodierenden Sequenz (core), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Luciferase) und die 3'-UTR des HCV.

Plasmid pHCV-FL miR122site2-5nts-stemloopII

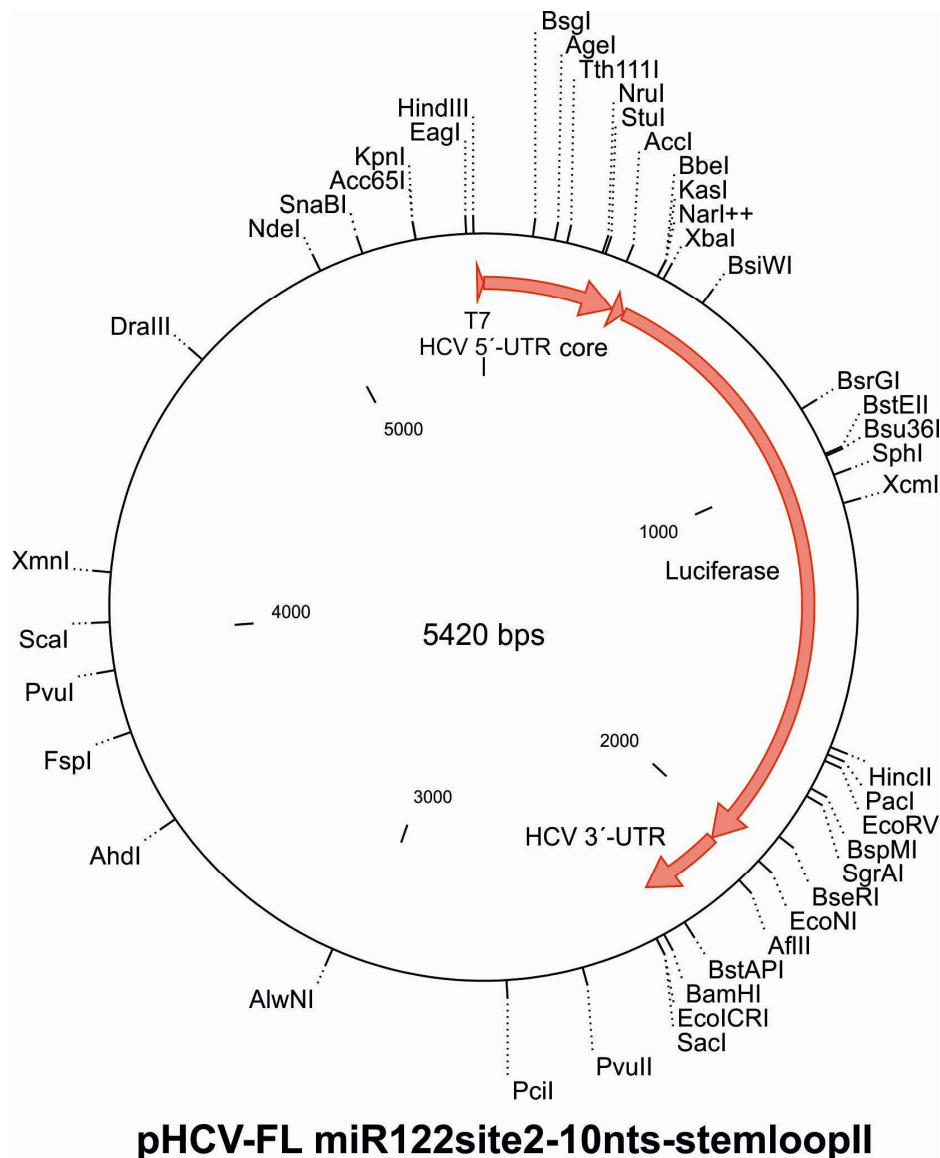


Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	5398	5415
HCV-5'-UTR	1	346
miR-122 site 1	21	27
miR-122 site 2	37	42
stem loop II	48	122
core	347	379
Luciferase	380	2032
HCV-3'-UTR	2033	2253

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfach vorhandenen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-UTR des HCV, ein Teil der Core-kodierenden Sequenz (core), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Luciferase) und die 3'-UTR des HCV.

Plasmid pHCV-FL miR122site2-10nts-stemloopII

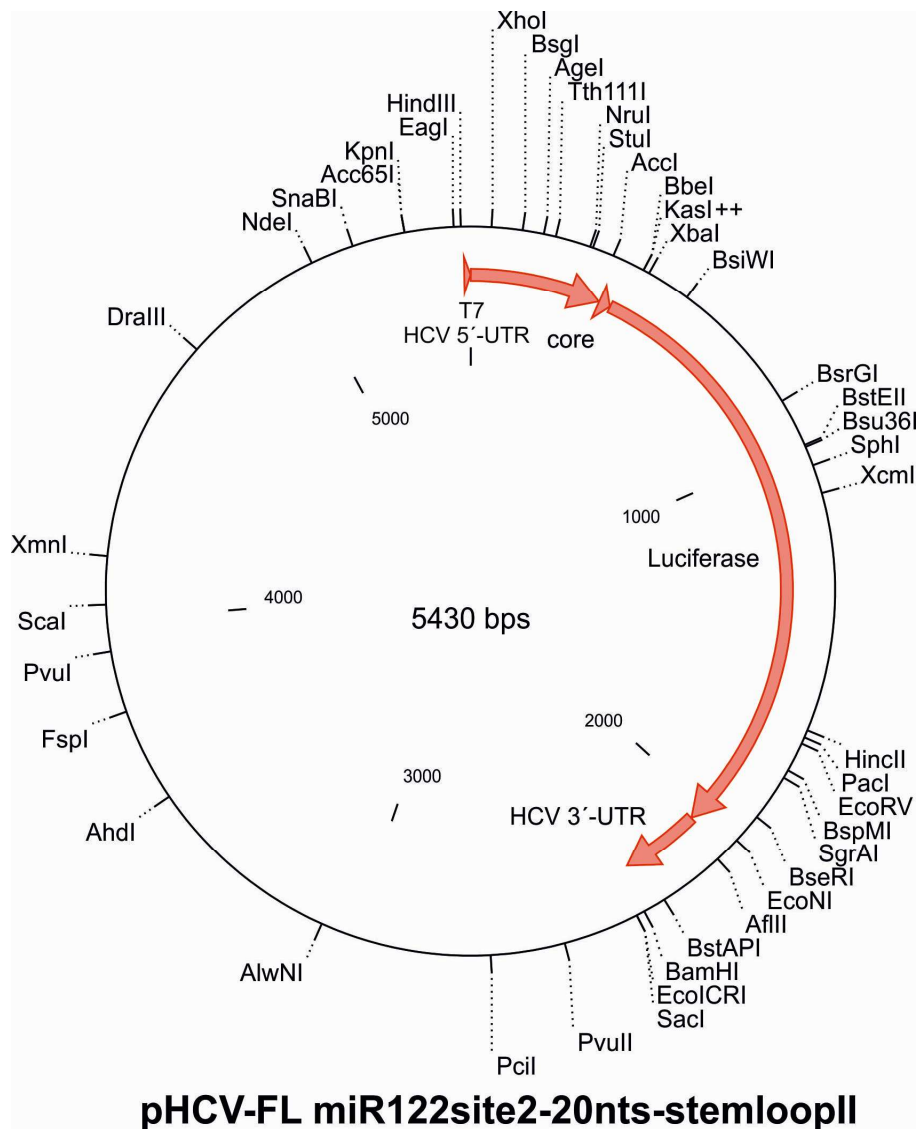


Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	5403	5420
HCV-5'-UTR	1	351
miR-122 site 1	21	27
miR-122 site 2	37	42
stem loop II	53	127
core	352	384
Luciferase	385	2037
HCV-3'-UTR	2038	2258

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfach vorhandenen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-UTR des HCV, ein Teil der Core-kodierenden Sequenz (core), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Luciferase) und die 3'-UTR des HCV.

Plasmid pHCV-FL mir122site2-20nts-stemloopII

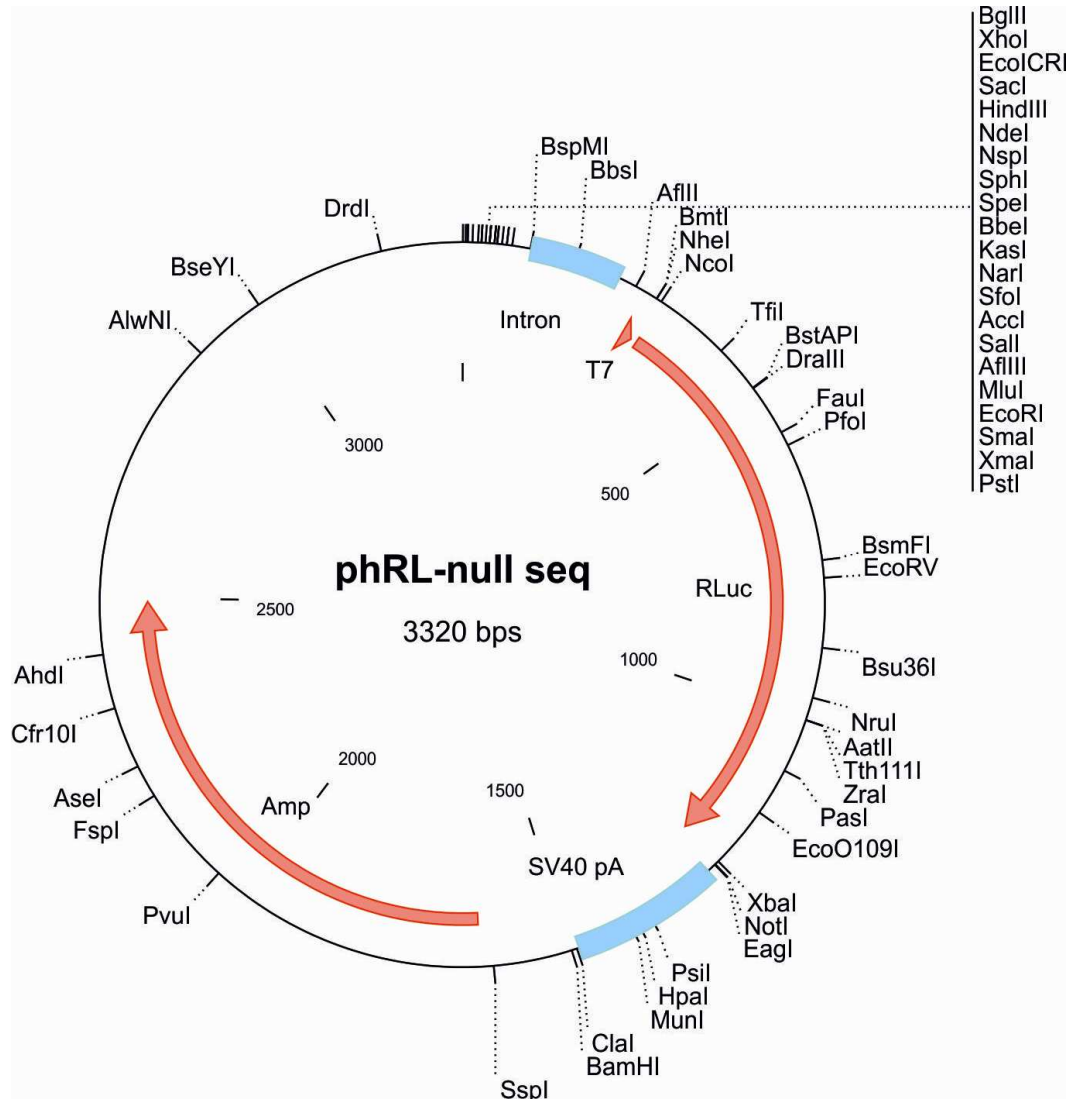


Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
T7	5413	5430
HCV-5'-UTR	1	361
miR-122 site 1	21	27
miR-122 site 2	37	42
stem loop II	63	137
core	362	394
Luciferase	395	2047
HCV-3'-UTR	2048	2268

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfach vorhandenen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der HCV-Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die 5'-UTR des HCV, ein Teil der Core-kodierenden Sequenz (core), die kodierende Sequenz für das *Firefly*-Luziferase-Protein (Luciferase) und die 3'-UTR des HCV.

Plasmid phRL-null seq



Plasmidbeschreibung

Region	Start [nt]	Ende [nt]
Intron	101	237
T7	281	299
RLuc	309	1244
SV40 p4	1266	1487
Amp	1634	2494

Auf dem äußeren Kreis sind alle einfach vorhandenen Restriktionsschnittstellen kartiert. Auf dem inneren Kreis zeigen die Pfeile die Bestandteile der Expressionskassette. Diese beginnt mit der Promotorsequenz des Bakteriophagen T7 (T7). Danach folgt die Sequenz für das *Renilla*-Luziferase-Protein (RLuc). Daran schließen die SV40-Polyadenylierungssignale (SV40) an, die eine effiziente Expression in der Zellkultur gewährleisten sollen, wenn direkt das Plasmid transfiziert wird.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikationen

K.D. Conrad, F. Giering, C. Erfurth, A. Neumann, C. Fehr, G. Meister und M. Niepmann (2013). MicroRNA-122 dependent binding of Ago2 protein to hepatitis C virus RNA is associated with enhanced RNA stability and translation stimulation. *PLoS One*. 2013;8(2):e56272.

Kongressbeiträge

K.D. Conrad, D. Goergen, C. Fehr, F. Giering, M. Niepmann. Ago2 protein mediates miR-122-dependent stimulation of Hepatitis C Virus IRES RNA translation in a distance-dependent manner. *Poster, 22nd Annual Meeting of the Society for Virology, Essen, März 2012*

K.D. Conrad, F. Giering, C. Erfurth, A. Neumann, C. Fehr, G. Meister, M. Niepmann. Ago2 protein mediates miR-122-dependent stimulation of hepatitis C virus IRES RNA translation in a distance-dependent manner. *Poster, Meeting on Translational Control of Cold Spring Harbor, New York, September 2012*

K.D. Conrad, F. Giering, C. Erfurth, A. Neumann, C. Fehr, G. Meister, M. Niepmann. Ago2 protein mediates miR-122-dependent stimulation of Hepatitis C virus IRES RNA translation in a distance-dependent manner. *Poster, 19th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Venedig, Oktober 2012*

Erklärung zur Dissertation

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, November 2013

Florian Giering

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben beziehungsweise mich während dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Mein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, die konstante Hilfestellung in sämtlichen Belangen sowie für die stete Ansprechbarkeit.

Außerordentlich danken möchte ich Dominik Conrad, der mich von Anfang an mit viel Geduld und Mühe in die Materie eingeführt hat und der stets Ansprechpartner und Motivator bei Problemen jeglicher Art war. Er hat nicht zuletzt auf Grund seiner Professionalität im Labor maßgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit zu einem erfolgreichen Ende geführt hat.

Danke auch an Dr. Christiane Jünemann sowie Dr. Carmen Fehr, die – letztere leider zuletzt nur noch als „Gast“ im Labor – vermutlich unbewusst viel Aufbauarbeit in manch verzweifelter Situation geleistet hat.

Danke sowieso an meine Freunde, meine Eltern und meinen Bruder für die Unterstützung in jeglicher Hinsicht!

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**